

## Artículo original

## Efectos beneficiosos de la simpatectomía renal sobre el remodelado vascular pulmonar en la hipertensión arterial primaria experimental

Zhao Qingyan<sup>a</sup>, Jiang Xuejun<sup>a</sup>, Tang Yanhong<sup>a</sup>, Dai Zixuan<sup>a</sup>, Wang Xiaozhan<sup>a</sup>, Wang Xule<sup>a</sup>, Guo Zongwen<sup>a</sup>, Hu Wei<sup>b</sup>, Yu Shengbo<sup>a</sup> y Huang Congxin<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Wuchang, Wuhan City, República Popular China<sup>b</sup> Department of Ultrasonography, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuchang, Wuhan City, República Popular China

## Historia del artículo:

Recibido el 7 de septiembre de 2014

Aceptado el 24 de noviembre de 2014

On-line el 21 de marzo de 2015

## Palabras clave:

Hipertensión arterial pulmonar

Inervación simpática renal

Ablación

Endotelina

Angiotensina II

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** La activación tanto del sistema nervioso simpático como del sistema renina-angiotensina-aldosterona está estrechamente relacionada con la hipertensión arterial pulmonar. Nuestra hipótesis era que la simpatectomía renal reduce la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona e inhibe la progresión de la hipertensión arterial pulmonar.**Métodos:** Se asignó aleatoriamente a un total de 22 perros *beagle* a tres grupos de estudio. Se efectuaron determinaciones de la dinámica pulmonar de esos animales antes y 8 semanas después de la inyección de 0,1 ml/kg de dimetilformamida (perros de control) o de 2 mg/kg de deshidromonocrotalina (perros con hipertensión arterial pulmonar y perros con hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal). Ocho semanas después de la inyección, se determinaron las concentraciones de neurohormonas y se evaluó la morfología del tejido pulmonar.**Resultados:** Se observó un aumento significativo de la concentración de angiotensina II y endotelina-1 en plasma después de 8 semanas en los perros con hipertensión arterial pulmonar, y los valores obtenidos en los tejidos pulmonares de estos animales eran superiores a los de los perros del grupo de control y el grupo de simpatectomía renal (medias: angiotensina II, 65 ± 9,8 frente a 38 ± 6,7 y 46 ± 8,1; endotelina-1, 96 ± 10,3 frente a 54 ± 6,2 y 67 ± 9,4; p < 0,01). La deshidromonocrotalina aumentó la presión arterial pulmonar media (16 ± 3,4 frente a 33 ± 7,3 mmHg; p < 0,01), y la simpatectomía renal evitó que se produjera este aumento. La proliferación celular del músculo liso pulmonar fue mayor en los perros con hipertensión arterial pulmonar que en los animales de los grupos de control y de hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal.**Conclusiones:** La simpatectomía renal atenúa el remodelado vascular pulmonar y reduce la presión arterial pulmonar en la hipertensión arterial pulmonar experimental. El efecto de la simpatectomía renal puede contribuir a reducir las concentraciones de neurohormonas.

© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Beneficial Effects of Renal Denervation on Pulmonary Vascular Remodeling in Experimental Pulmonary Artery Hypertension

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Activation of both the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin-aldosterone system is closely associated with pulmonary arterial hypertension. We hypothesized that renal denervation decreases renin-angiotensin-aldosterone activity and inhibits the progression of pulmonary arterial hypertension.**Methods:** Twenty-two beagles were randomized into 3 groups. The dogs' pulmonary dynamics were measured before and 8 weeks after injection of 0.1 mL/kg dimethylformamide (control dogs) or 2 mg/kg dehydromonocrotaline (pulmonary arterial hypertension and pulmonary arterial hypertension + renal denervation dogs). Eight weeks after injection, neurohormone levels and pulmonary tissue morphology were measured.**Results:** Levels of plasma angiotensin II and endothelin-1 were significantly increased after 8 weeks in the pulmonary arterial hypertension dogs and were higher in the lung tissues of these dogs than in those of the control and renal denervation dogs (mean [standard deviation] angiotensin II: 65 [9.8] vs 38 [6.7], 46 [8.1]; endothelin-1: 96 [10.3] vs 54 [6.2], 67 [9.4]; P < .01). Dehydromonocrotaline increased the mean pulmonary arterial pressure (16 [3.4] mmHg vs 33 [7.3] mmHg; P < .01), and renal denervation

## Keywords:

Pulmonary arterial hypertension

Renal sympathetic nerve

Ablation

Endothelin

Angiotensin II

## VÉASE CONTENIDO RELACIONADO:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recesp.2015.03.011>, Rev Esp Cardiol. 2015;68:551-3.

\* Autor para correspondencia: Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuhan 430060, República Popular China.

Correo electrónico: [huangcongxin@vip.163.com](mailto:huangcongxin@vip.163.com) (H. Congxin).<http://dx.doi.org/10.1016/j.recesp.2014.11.025>

0300-8932/© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

prevented this increase. Pulmonary smooth muscle cell proliferation was higher in the pulmonary arterial hypertension dogs than in the control and pulmonary arterial hypertension + renal denervation dogs.

**Conclusions:** Renal denervation attenuates pulmonary vascular remodeling and decreases pulmonary arterial pressure in experimental pulmonary arterial hypertension. The effect of renal denervation may contribute to decreased neurohormone levels.

Full English text available from: [www.revespcardiol.org/en](http://www.revespcardiol.org/en)

© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Abreviaturas

All: angiotensina II  
DHMC: deshidromonocrotalina  
ET-1: endotelina-1  
HAP: hipertensión arterial pulmonar  
SR: simpatectomía renal

## INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad mortal que se caracteriza por un remodelado vascular pulmonar excesivo que conduce a aumento de la presión en el sistema vascular pulmonar y del lado derecho del corazón<sup>1</sup>. Aunque se continúa sin conocer por completo la patogenia de la HAP, en estudios previos se ha involucrado al aumento de la actividad del sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona<sup>2,3</sup>. Se ha señalado que el aumento de la activación del sistema nervioso simpático podría contribuir a producir la hiperventilación alveolar observada en los pacientes con HAP<sup>4,5</sup>. Se ha observado que el aumento de las concentraciones plasmáticas de renina y angiotensina II (All) tiene estrecha relación con la progresión y el pronóstico de la HAP<sup>6</sup>. Existen numerosos tratamientos que se han demostrado útiles para reducir la HAP, pero ninguno de ellos tiene efectos a largo plazo<sup>7,8</sup>.

En estudios previos se ha confirmado que puede alcanzarse una reducción significativa de la liberación de noradrenalina renal y de la presión tras una simpatectomía renal percutánea (SR)<sup>9,10</sup>. En el estudio previo se demostró que las concentraciones plasmáticas de All se atenuaban tras una SR<sup>11,12</sup>. No se sabe si la SR influye en las demás neurohormonas y la progresión de la HAP. En consecuencia, en el presente estudio, se examinaron las repercusiones de la SR en el remodelado vascular pulmonar y las neurohormonas en la HAP experimental.

## MÉTODOS

### Preparación del modelo animal

En el presente estudio se utilizaron 22 perros *beagle* de ambos sexos, con una media  $\pm$  desviación estándar de peso de  $13,5 \pm 2,4$  kg. El estudio se atuvo a lo establecido en la versión actual de *Guide for the care and use of laboratory animals (Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio)*, publicada por los *National Institutes of Health* (n.º 85-23, revisión de 1996). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Wuhan. El manejo de los animales se realizó según lo establecido por la Directiva de Investigación con Animales de Wuhan.

Se administró una inyección intramuscular de sulfato de quetamina (25 mg/kg) antes de la medicación de pentobarbital

sódico. Se administró a todos los perros pentobarbital sódico (30 mg/kg por vía intravenosa), se les intubó y se les ventiló con aire ambiental con suplemento de oxígeno utilizando un respirador (MAO01746, Harvard Apparatus; Holliston, Montana, Estados Unidos). Se realizó una monitorización continua del electrocardiograma empleando las derivaciones I, II y III. El grupo 1 lo formaron 7 perros a los que se administró dimetilformamida (0,1 ml/kg). El grupo 2 lo formaron 8 perros a los que se administró deshidromonocrotalina (DHMC). El grupo 3 lo formaron 7 perros a los que se administró DHMC y se les practicó ablación arterial renal. El grupo 1 se consideró de control (con objeto de descartar el efecto de la dimetilformamida sobre la HAP, se utilizó la dimetilformamida como control), el grupo 2 fue el grupo de HAP, y el grupo 3 fue el grupo de HAP + SR.

La DHMC se sintetizó artificialmente según lo descrito por Mattocks et al<sup>13</sup>. La pureza de la DHMC se determinó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento<sup>14</sup>. La DHMC se disolvió en dimetilformamida (0,1 ml/kg) inmediatamente antes de la inyección.

### Protocolo del estudio

Después de obtener una anestesia estable, se inyectaron a todos los animales 1.000 U de heparina y se introdujeron vainas hemostáticas en la vena femoral derecha. Con guía de fluoroscopia, se introdujo por la vena un catéter pulmonar Swan-Ganz 6 Fr (Edwards Lifesciences; Irvine, California, Estados Unidos) lleno de una solución salina heparinizada. El catéter se conectó a un transductor de presión y a un sistema de monitorización Vigilance. El catéter arterial pulmonar se introdujo en las arterias pulmonares pequeñas a través de la aurícula y el ventrículo derechos. A continuación se retiró el catéter, y se realizaron determinaciones de la presión capilar pulmonar enclavada, la presión arterial pulmonar sistólica, la presión arterial pulmonar media, la presión sistólica ventricular derecha y la presión media ventricular derecha. Se determinó el gasto cardiaco con el método de termodilución continua utilizando el sistema de monitorización Vigilance. Se calculó la resistencia vascular pulmonar según la fórmula (resistencia vascular pulmonar =  $80 \times$  [presión arterial pulmonar media - presión capilar pulmonar enclavada] / gasto cardiaco). Después de las determinaciones hemodinámicas basales, a los animales de los grupos de HAP y de HAP + SR se les inyectó DHMC (2 mg/kg), y a los animales de control, dimetilformamida (0,1 ml/kg) mediante un catéter arterial pulmonar Swan-Ganz introducido en la aurícula derecha. En el grupo de HAP + SR, después de las determinaciones hemodinámicas basales, se llevó a cabo la intervención de SR igual que en un estudio previo<sup>15</sup>. A continuación se dejó que todos los animales se recuperaran durante 8 semanas. Después de 8 semanas, se repitieron todas las determinaciones hemodinámicas en los tres grupos.

### Ecocardiografía

Se realizó una ecocardiografía transtorácica bidimensional y Doppler en todos los animales (IE33, S5-1, PHILIPS; Países Bajos) en

la situación basal y nuevamente al cabo de 8 semanas. Se obtuvieron proyecciones estándares bidimensionales paraesternales cortas y largas, así como proyecciones apicales tetracamerales, bicamerales y tricamerales. Se determinaron las dimensiones auricular izquierda, auricular derecha, diastólica ventricular izquierda y diastólica ventricular derecha mediante la fórmula biplanar de Simpson. Las determinaciones de todos los volúmenes se realizaron por triplicado, y se presentaron los valores medios. Se analizó el *strain* longitudinal telesistólico ventricular derecho mediante la técnica de *speckle tracking* (rastreo de marcas) bidimensional. Un experto en ecocardiografía independiente revisó las imágenes y los parámetros.

### Análisis bioquímicos

Se extrajeron 4 ml de sangre venosa en tubos Vacutainer con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se centrifugaron a 2.310 g durante 10 min a 4 °C (Beckman Coulter, Avanti J-E) en la situación basal y de nuevo al cabo de 8 semanas. Se separó el suero, se colocó en microtubos y se conservó a -80 °C hasta el momento del análisis. Se determinaron las concentraciones de creatinina, AII, prostaglandina E<sub>2</sub> y endotelina-1 (ET-1) mediante un ELISA. Se aisló el lóbulo inferior del pulmón izquierdo tras una toracotomía. Se determinaron las concentraciones de AII, prostaglandina E<sub>2</sub> y ET-1 en el pulmón con un método descrito con anterioridad<sup>16</sup>. Se obtuvieron muestras de tejido de la base del ventrículo derecho de todos los animales al cabo de 8 semanas. Se determinaron las concentraciones de aldosterona y péptido natriurético tipo B mediante un ELISA.

### Exámenes histológicos

Los pulmones izquierdos extirpados se procesaron para el examen de microscopía óptica aplicando métodos convencionales. Se trocearon las muestras de tejido en fragmentos pequeños, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 3 μm de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los cortes se observaron, se analizaron y se fotografiaron con un microscopio óptico Nikon eclipseCi. Se identificaron las arterias pulmonares como vasos con dos láminas elásticas claramente definidas, con una capa de células de músculo liso entre las dos láminas. Se midió el grosor de la pared de las arterias de 15 arterias musculares a 400 aumentos.

Se determinó la expresión del receptor de AII tipo 1 (AT<sub>1</sub>) y los receptores de AII tipo 2 (AT<sub>2</sub>) en la arteria pulmonar mediante el método de *Western blot*. Se bloquearon las membranas con leche seca sin grasa al 5% en solución salina tamponada Tris con Tween durante 1 h y se incubaron durante una noche a 4 °C con los anticuerpos primarios (anticuerpos anti-AT<sub>1</sub> y anti-AT<sub>2</sub> monoclonales de conejo [Santa Cruz Biotechnology Inc.; Dallas, Texas, Estados Unidos], utilizados a 1:500; anticuerpo antiactina de conejo [Santa Cruz Biotechnology Inc.], utilizado a 1:1.000). A continuación se lavaron en solución salina tamponada Tris con Tween tres veces, se incubaron con el segundo anticuerpo durante 1 h a 37 °C, y se realizó el revelado con sustrato de peroxidasa de rábano Inmun-Star. Se determinó la expresión relativa de proteína con un programa informático analizador de imagen (AlphaEase FC, Estados Unidos).

Se diseccionaron del corazón cortes del ventrículo y se conservaron rápidamente a -80 °C. Se obtuvieron cortes ventriculares derechos del infundíbulo de salida ventricular derecho. Se utilizó la tinción de tricrómico de Masson para identificar el aumento de concentración de fibrosis intersticial. El tejido conjuntivo se diferenció por su color y se expresó como porcentaje del área de tejido de referencia (NIKON Ti-s, Japón). Se excluyeron de la cuantificación del tejido conjuntivo los vasos sanguíneos y las

células intersticiales perivasculares. Se determinó la fracción de volumen de colágeno intersticial mediante morfometría cuantitativa con un analizador de imagen (IPP 6.0, Media Cybernetics; Georgia, Estados Unidos).

### Análisis estadístico

Los valores se presentan en forma de media ± desviación estándar. Los resultados de la ecocardiografía en los grupos de HAP y de HAP + SR se compararon para el periodo posterior al estudio mediante la prueba de la t para datos apareados, y se utilizaron pruebas de la t de Student para dos muestras independientes en la comparación de las medias de los dos grupos. Se utilizaron pruebas de análisis de la varianza en forma de pruebas de Neuman-Keuls para la comparación de las medias de las variables continuas en múltiples grupos, y toda diferencia significativa observada se analizó luego con la prueba de Tukey-Kramer. Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales, y se exigió un valor de probabilidad < 0,05 para establecer la significación estadística.

## RESULTADOS

### Características de los modelos animales

No hubo diferencias significativas de la presión arterial, la frecuencia cardíaca o el peso corporal en la situación basal entre los tres grupos experimentales. En el grupo de HAP + SR, la presión arterial sistólica se redujo después de 8 semanas, pero esta disminución no alcanzó significación estadística. Los perros con HAP empezaron a presentar una respiración rápida y disminución del apetito a partir del décimo día tras la inyección. El color del pulmón fue más pálido en los perros con HAP y con HAP + SR que en los animales de control. Las características existentes en la situación basal y después de 8 semanas se presentan en la [tabla 1](#).

### Ecocardiografía y parámetros hemodinámicos

En cambio, el diámetro auricular derecho aumentó significativamente después de 8 semanas en los perros con HAP (p = 0,02). No se observaron diferencias significativas en el diámetro auricular derecho antes o después de 8 semanas en los grupos de control y de HAP + SR. Se observaron también aumentos significativos del diámetro diastólico ventricular derecho en los perros con HAP. El diámetro diastólico ventricular derecho presentó un aumento en el grupo de HAP + SR después de 8 semanas, pero este aumento no tuvo significación estadística (p = 0,09). Después de 8 semanas, el *strain* longitudinal de la pared lateral del ventrículo derecho se redujo en el grupo de HAP y en el grupo de HAP + SR. Sin embargo, el *strain* longitudinal fue superior en el grupo de HAP + SR que en el de HAP ([tabla 2](#)).

Los datos hemodinámicos en la situación basal y después de 8 semanas de los tres grupos se presentan en la [tabla 3](#). No hubo diferencias significativas en los índices hemodinámicos pulmonares basales de los tres grupos. En comparación con el valor basal, la presión arterial pulmonar y la presión ventricular derecha fueron superiores después de 8 semanas en el grupo de HAP. No hubo diferencias significativas en los parámetros hemodinámicos en la situación basal y después 8 semanas en el grupo de control. La presión arterial pulmonar y la presión ventricular derecha aumentaron después de 8 semanas en el grupo de HAP + SR, pero estos parámetros hemodinámicos fueron inferiores en los perros del grupo de HAP + SR que en el grupo de HAP.

**Tabla 1**

Características de los modelos animales

	Presión arterial (mmHg)		FC (lpm)	Peso corporal (kg)	FR (rpm)
	Sistólica	Diastólica			
<b>Control</b>					
Basal	139 ± 14	96 ± 13	160 ± 21	13,0 ± 2,3	36,6 ± 3,7
Tras 8 semanas	138 ± 13	94 ± 12	157 ± 22	14,2 ± 2,1	34,3 ± 3,2
<b>HAP</b>					
Basal	140 ± 15	93 ± 11	157 ± 23	13,2 ± 2,5	35,2 ± 3,9
Tras 8 semanas	141 ± 13	96 ± 14	164 ± 25	14,9 ± 2,4	46,7 ± 4,4*
<b>HAP + SR</b>					
Basal	137 ± 12	95 ± 14	155 ± 24	13,1 ± 2,2	34,1 ± 3,3
Tras 8 semanas	125 ± 11	83 ± 6	149 ± 19	14,5 ± 2,3	38,4 ± 3,9

FC: frecuencia cardiaca; FR: frecuencia respiratoria; HAP: hipertensión arterial pulmonar; lpm: latidos por minuto; rpm: respiraciones por minuto; SR: simpatectomía renal.

Los datos expresan media ± desviación estándar.

\* p < 0,01 para la hipertensión arterial pulmonar en comparación con el valor basal.

## Análisis de ELISA

El grupo de HAP presentó un aumento estadísticamente significativo de las concentraciones de AII en plasma y en tejido pulmonar al final del protocolo (p < 0,01) en comparación con el valor basal (tabla 4). No hubo diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de AII entre la determinación basal y el final del estudio en los grupos de control y de HAP + SR. Entre la situación basal y el final del estudio, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de creatinina en plasma ni en las de prostaglandina E<sub>2</sub> en tejido pulmonar de los tres grupos.

No se dieron diferencias significativas en la situación basal entre los tres grupos en cuanto a las concentraciones de ET-1 en suero. Después de 8 semanas, las concentraciones de ET-1 en suero aumentaron (p < 0,01) en los perros con HAP, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los animales de control. En el grupo de HAP + SR, la concentración de ET-1 en suero se redujo después de 8 semanas, pero esta disminución no alcanzó significación estadística (p = 0,19). La concentración de ET-1 en el tejido pulmonar fue significativamente superior en el grupo de HAP que en el de control (p < 0,01). Además, la concentración de ET-1 en el tejido pulmonar fue superior en el grupo de HAP + SR que en el de control (p = 0,01).

Se estudió con mayor detalle las concentraciones de aldosterona y de péptido natriurético tipo B en el ventrículo derecho. Los

resultados indicaron que las cifras de aldosterona y péptido natriurético tipo B en las muestras de tejido de la base del ventrículo derecho eran más altas en los dos grupos en que se había inducido HAP que en los animales de control. Tiene interés señalar que las concentraciones de aldosterona y de péptido natriurético tipo B en el ventrículo derecho del grupo de HAP fueron superiores a las observadas en el de HAP + SR. Esto confirma que el grupo de HAP + SR presentó un remodelado ventricular derecho menos intenso que el grupo de HAP (tabla 4).

## Estudios de morfología y de Western blot

La tinción de hematoxilina-eosina mostró en el grupo de HAP un engrosamiento significativo de la íntima y estenosis luminal en comparación con el grupo de HAP + SR. En la figura 1 se muestran cambios representativos observados en la estructura vascular de los tres grupos. La oclusión por neointima se evaluó mediante puntuación de oclusión vascular. Se calculó una puntuación de oclusión vascular media de los 30 vasos seleccionados para cada uno de los perros como índice de la oclusión vascular. Los resultados pusieron de manifiesto que se producían lesiones de neointima en el 64% de las arterias pulmonares pequeñas seleccionadas del grupo de HAP. La media de la puntuación de oclusión vascular fue de 1,17 en esas arterias. En cambio, los perros

**Tabla 2**

Cambios de los parámetros ecocardiográficos en la situación basal y a las 8 semanas en los 3 grupos

	DAD (mm)	DAI (mm)	DDVD (mm)	DDVI (mm)	Strain longitudinal del VD (%)
<b>Control</b>					
Basal	17,1 ± 1,3	17,5 ± 1,2	11,3 ± 0,6	27,4 ± 2,1	21,2 ± 1,1
Tras 8 semanas	16,9 ± 1,2	17,6 ± 1,1	11,7 ± 0,7	27,6 ± 2,3	20,7 ± 1,0
<b>HAP</b>					
Basal	16,6 ± 1,5	16,9 ± 1,3	11,8 ± 0,5	28,1 ± 2,5	21,0 ± 0,9
Tras 8 semanas	18,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	17,1 ± 1,3	13,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	27,3 ± 2,3	16,3 ± 1,3 <sup>a</sup>
<b>HAP + SR</b>					
Basal	16,8 ± 1,2	17,3 ± 1,5	11,1 ± 0,7	27,9 ± 2,4	20,9 ± 1,1
Tras 8 semanas	17,2 ± 1,4	17,5 ± 1,4	12,1 ± 0,7	27,7 ± 1,9	18,7 ± 0,9 <sup>b,c</sup>

DAD: diámetro auricular derecho; DAI: diámetro auricular izquierdo; DDVD: diámetro diastólico ventricular derecho; DDVI: diámetro diastólico ventricular izquierdo; HAP: hipertensión arterial pulmonar; SR: simpatectomía renal; VD: ventrículo derecho.

Los datos expresan media ± desviación estándar.

<sup>a</sup> p < 0,01 para la hipertensión arterial pulmonar en comparación con el valor basal.

<sup>b</sup> p < 0,05 para la hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal en comparación con el valor basal.

<sup>c</sup> p < 0,05 para la hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal en comparación con la hipertensión arterial pulmonar.

**Tabla 3**

Cambios de los parámetros ecocardiográficos en la situación basal y a las 8 semanas en los tres grupos

	PSVD (mmHg)	PMVD (mmHg)	PAPS (mmHg)	PAPM (mmHg)	PCPE (mmHg)	RVP (dyn·s/cm <sup>5</sup> )	GC (l/min)
<b>Control</b>							
Basal	23 ± 6,1	11 ± 4,2	24 ± 7,6	15 ± 3,5	8,3 ± 1,5	119 ± 65	4,5 ± 0,3
Tras 8 semanas	23 ± 5,7	11 ± 4,1	25 ± 7,1	14 ± 3,7	8,1 ± 1,6	105 ± 69	4,5 ± 0,3
<b>HAP</b>							
Basal	22 ± 5,8	12 ± 4,4	26 ± 7,2	16 ± 3,4	8,1 ± 1,6	137 ± 71	4,6 ± 0,4
Tras 8 semanas	43 ± 8,7 <sup>a</sup>	25 ± 6,3 <sup>a</sup>	45 ± 11,2 <sup>a</sup>	33 ± 7,3 <sup>a</sup>	8,7 ± 1,8	550 ± 94 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>HAP + SR</b>							
Basal	21 ± 6,2	11 ± 3,8	23 ± 7,2	14 ± 3,6	8,4 ± 1,7	97 ± 75	4,6 ± 0,4
Tras 8 semanas	31 ± 6,8 <sup>b,c</sup>	18 ± 4,5 <sup>b,c</sup>	33 ± 7,9 <sup>b,c</sup>	25 ± 3,9 <sup>b,c</sup>	8,0 ± 1,8	358 ± 88 <sup>b,c</sup>	3,8 ± 0,4 <sup>b,c</sup>

GC: gasto cardiaco; HAP: hipertensión arterial pulmonar; PAPM: presión arterial pulmonar media; PAPS: presión arterial pulmonar sistólica; PCPE: presión capilar pulmonar enclavada; PMVD: presión media ventricular derecha; PSVD: presión sistólica ventricular derecha; RVP: resistencia vascular pulmonar; SR: simpatectomía renal.

Los datos expresan media ± desviación estándar.

<sup>a</sup> p < 0,01 para hipertensión arterial pulmonar en comparación con el valor basal.

<sup>b</sup> p < 0,05 para hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal en comparación con hipertensión arterial pulmonar.

<sup>c</sup> p < 0,05 para hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal en comparación con el valor basal.

del grupo de HAP + SR desarrollaron lesiones de neointima en el 27% de las arterias pulmonares seleccionadas, y la media de la puntuación de oclusión vascular fue de 0,24. La diferencia entre el grupo de HAP y el grupo de HAP + SR fue significativa (1,17 ± 0,13 frente a 0,24 ± 0,10; p < 0,01). Las arterias pulmonares pequeñas del grupo de control mostraron una media de puntuación de oclusión vascular de 0.

En la figura 2 se muestra un ejemplo de la tinción de tricrómico de Masson en los cortes de tejido. Los cortes ventriculares de los animales del grupo de HAP + SR presentaron significativamente menos fibrosis que los perros con HAP, mientras que los animales del grupo de HAP + SR presentaron más fibrosis que los perros de control. Por ejemplo, las imágenes de los corazones de animales con HAP revelaron la presencia de una gran cantidad de fibrosis (19,4 [3,8%]), mientras que en los perros de control se observó un tejido fibroso mínimo (4,1 [0,9%]) y los perros con HAP + SR presentaron un tejido fibroso moderado (11,2 [2,6%]).

En la figura 3 se comparan los resultados del Western blot de la arteria pulmonar en los tres grupos. Todas las mediciones de las bandas de *immunoblot* se normalizaron respecto a la intensidad de la banda de actina β de la muestra cargada. Se determinaron las densidades de bandas y se realizó una cuantificación relativa de las densidades de AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>. Tal como se muestra en las

figuras 3 A y B, la expresión de AT<sub>1</sub> en la arteria pulmonar fue mayor en el grupo de HAP que en los grupos de control y de HAP + SR (1,02 ± 0,11 frente a 0,39 ± 0,04 y 0,38 ± 0,05; p < 0,01). No hubo diferencias significativas en la densidad de AT<sub>2</sub> de los tres grupos (0,44 ± 0,04 frente a 0,41 ± 0,05 y 0,42 ± 0,04; p = 0,38) (figuras 3 C y D).

## DISCUSIÓN

El presente estudio exploró las repercusiones de la SR en el remodelado vascular pulmonar en la HAP experimental. Se presentan evidencias indicativas de que: a) la SR atenuó la HAP inducida por el tratamiento de DHMC en los perros *beagle*, según indica la ausencia de un aumento significativo de la presión arterial pulmonar, el grosor de la pared vascular y el aumento del gasto cardiaco, y b) la disminución de las concentraciones de AII y ET-1 después de la SR se asoció al remodelado vascular pulmonar, el cual fue inducido por el tratamiento de DHMC. Los resultados de este estudio indican que la SR percutánea podría ser una alternativa efectiva para el tratamiento de la HAP.

La HAP se caracteriza por elevaciones de la presión arterial pulmonar y la resistencia vascular pulmonar. En la patogenia de la HAP intervienen múltiples factores, como la vasoconstricción, el remodelado de los vasos pulmonares y la trombosis<sup>17,18</sup>. La

**Tabla 4**

Cambios de las concentraciones de neurohormonas en sangre, tejido pulmonar y tejido ventricular en la situación basal y después de 8 semanas en los tres grupos

	Creatinina plasmática (μmol/l)	Aldosterona ventricular (pg/mg)	BNP ventricular (pg/mg)	Angiotensina II (pg/ml)		Prostaglandina (pg/ml)		Endotelina-1 (pg/ml)	
				Plasma	Tejido pulmonar	Plasma	Tejido pulmonar	Plasma	Tejido pulmonar
<b>Control</b>									
Basal	76 ± 9,2				122 ± 33		538 ± 102		72 ± 6,8
Tras 8 semanas	79 ± 9,4	67 ± 14	0,5 ± 0,1	131 ± 35	38 ± 6,7	561 ± 131	214 ± 67	75 ± 6,2	54 ± 6,2
<b>HAP</b>									
Basal	79 ± 10,6				113 ± 34		602 ± 112		77 ± 7,2
Tras 8 semanas	82 ± 11,4	172 ± 25 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	228 ± 41 <sup>b</sup>	65 ± 9,8 <sup>a</sup>	683 ± 158	289 ± 84	135 ± 14,6 <sup>b</sup>	96 ± 10,3 <sup>a</sup>
<b>HAP + SR</b>									
Basal	74 ± 10,7				119 ± 34		512 ± 132		74 ± 7,1
Tras 8 semanas	77 ± 11,6	105 ± 21 <sup>c</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	136 ± 43	46 ± 8,1	486 ± 138	265 ± 93	69 ± 6,5	67 ± 9,4 <sup>d</sup>

BNP: péptido natriurético tipo B; HAP: hipertensión arterial pulmonar; SR: simpatectomía renal.

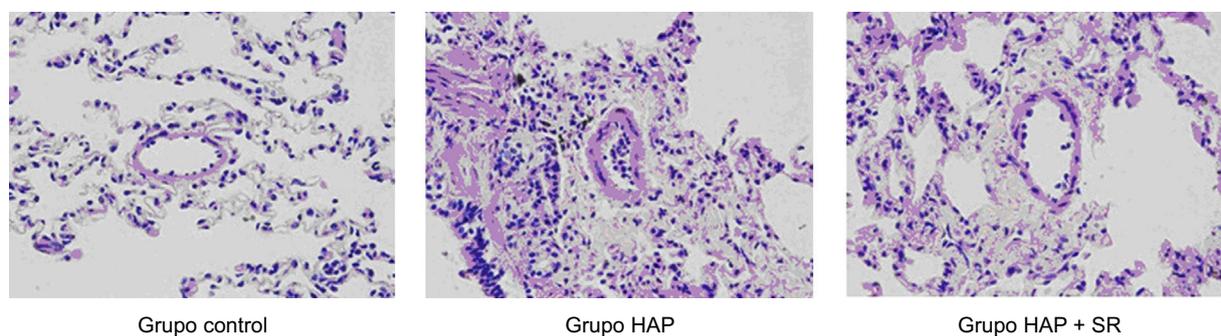
Los datos expresan media ± desviación estándar.

<sup>a</sup> p < 0,01 para la hipertensión arterial pulmonar en comparación con los grupos de control y de hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal.

<sup>b</sup> p < 0,01 para la hipertensión arterial pulmonar en comparación con el valor basal.

<sup>c</sup> p < 0,01 para la hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal en comparación con el grupo de control.

<sup>d</sup> p = 0,01 para la hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal en comparación con el grupo de control.

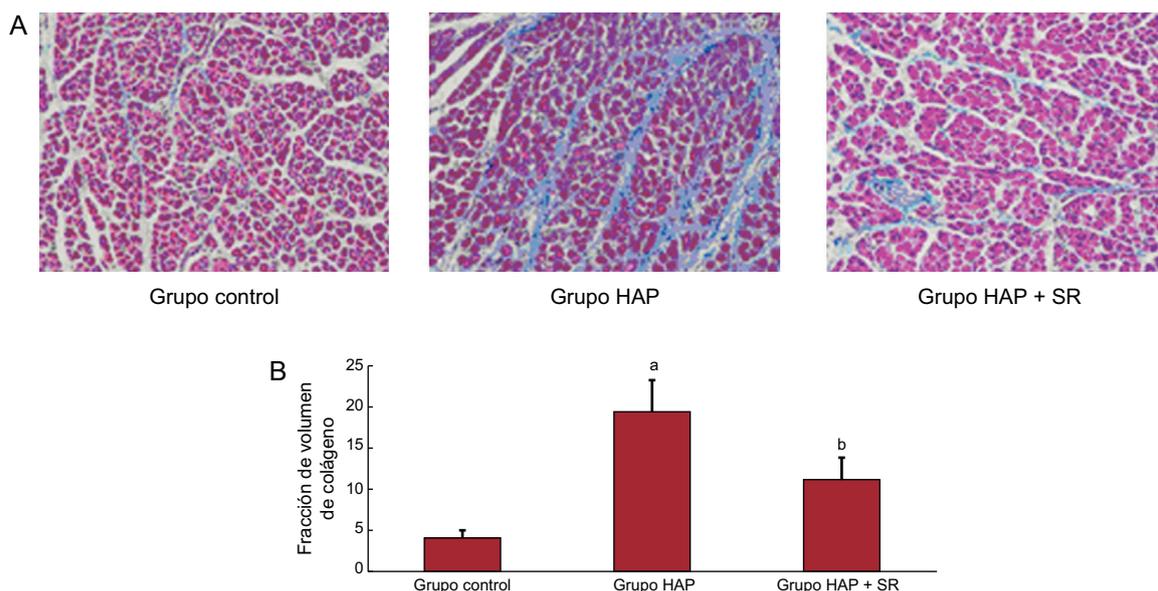


**Figura 1.** Cambios representativos observados en la estructura vascular de los tres grupos. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina ( $\times 400$ ). HAP: hipertensión arterial pulmonar; SR: simpatectomía renal. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina ( $\times 400$ ).

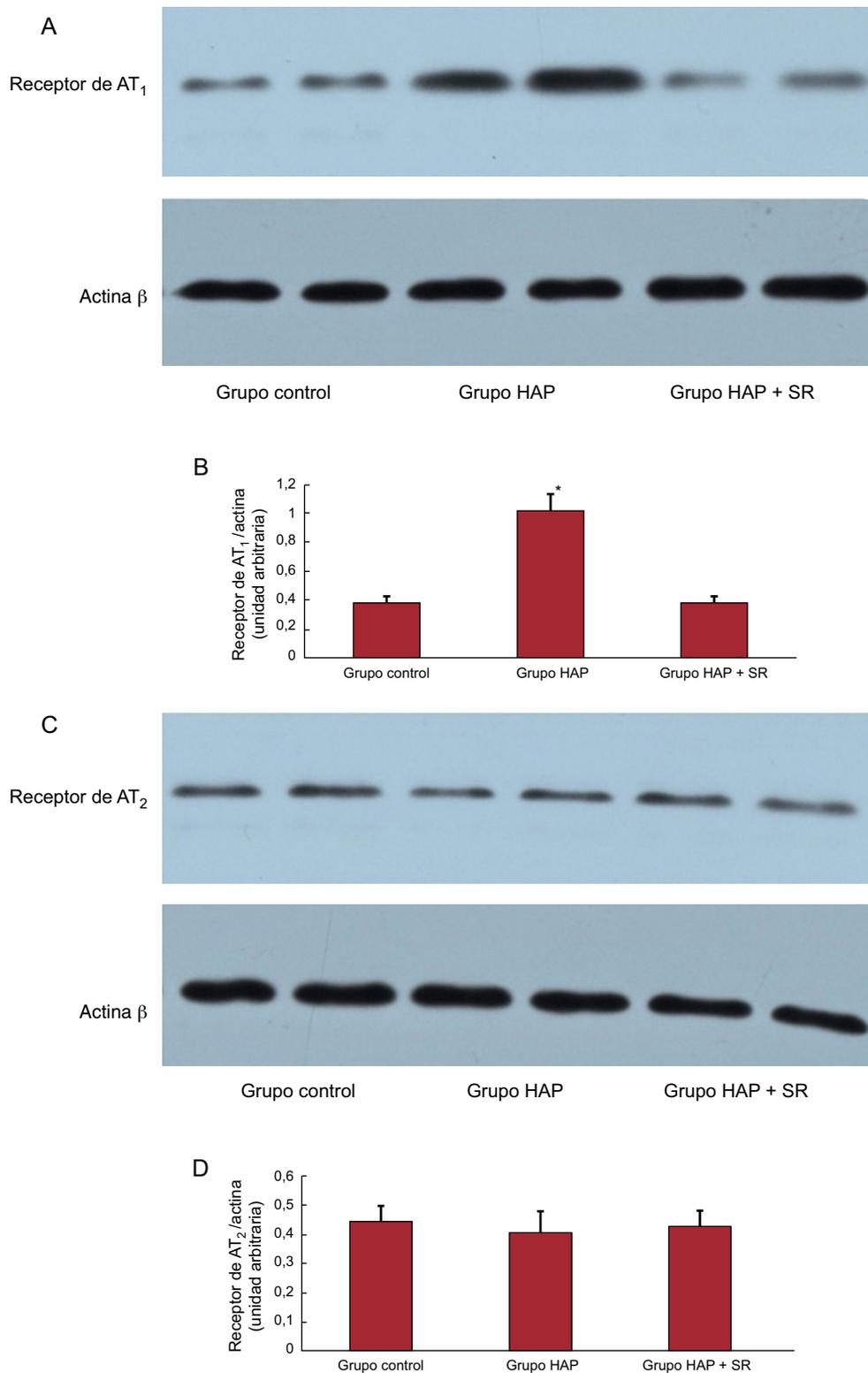
actividad nerviosa simpática es también un factor causal importante en el desarrollo de la HAP<sup>2,19</sup>. En el modelo animal de la HAP aguda, el aumento de la presión arterial pulmonar fue abolido por completo por la denervación de la arteria pulmonar<sup>20,21</sup>. En los pacientes con HAP, se ha apuntado que la actividad sistémica del sistema renina-angiotensina-aldosterona está aumentada, dada la observación de un aumento de la actividad del SNS. En estudios previos se ha demostrado que la AII puede causar crecimiento/proliferación e hipertrofia de las células musculares de la arteria pulmonar, induciendo con ello la resistencia arterial pulmonar<sup>22,23</sup>.

En algunos estudios previos se ha realizado análisis para determinar las concentraciones de AII antes y después de la SR. Se observó que la disminución de la liberación de AII indicaba la efectividad del dispositivo para conseguir una SR eferente<sup>12,24</sup>. Para investigar si la SR tiene repercusiones en el remodelado vascular pulmonar, en el presente estudio se utilizó el modelo de HAP experimental. La monocrotalina es una toxina vegetal alcaloide de pirrolizidina que, cuando se activa, causa un remodelado estructural de los vasos sanguíneos pulmonares y un aumento de la presión arterial pulmonar<sup>25,26</sup>. Estos resultados concuerdan con los de investigaciones previas que han mostrado

que la presión de la arteria pulmonar y la presión ventricular derecha en los perros con HAP fueron significativamente superiores y que el gasto cardiaco fue inferior a lo observado en los perros de control. Tiene interés señalar que, en el presente estudio, se observó que la presión arterial pulmonar y la presión ventricular derecha en el grupo de HAP + SR fueron significativamente inferiores a las observadas en el grupo de HAP. Además, el engrosamiento de la pared arterial pulmonar se redujo después de la SR. Un estudio previo ha indicado que las concentraciones plasmáticas de ET-1 circulante están elevadas en los animales tratados con monocrotalina<sup>27</sup>. Estos datos ponen de manifiesto que la SR reduce las concentraciones de AII en plasma y las de ET-1 en el tejido pulmonar. Las concentraciones plasmáticas de ET-1 circulante están elevadas en los pacientes con HAP, y el aumento de las concentraciones de ET-1 circulante se correlaciona con el aumento de la resistencia vascular pulmonar y el aumento de la mortalidad de los pacientes con HAP<sup>23,28</sup>. Los estudios iniciales realizados por Nakamura y Johns<sup>29</sup> señalaron que una estimulación nerviosa renal leve aumentaba las concentraciones de angiotensinógeno en el riñón de la rata. En otro estudio, Girchev et al<sup>30</sup> demostraron que la SR reduce la concentración papilar de ET-1 en las ratas Wistar-Kyoto. Estos resultados indicaron que los



**Figura 2.** Cambios histológicos representativos en los tres grupos. Las áreas rojas corresponden a miocitos y las azules, a colágeno ( $\times 400$ ). A: ejemplos del infundíbulo de salida del ventrículo derecho en los tres grupos. B: resumen de los cambios en el infundíbulo de salida del ventrículo derecho. En cambio, los cortes del ventrículo derecho de perros con hipertensión arterial pulmonar presentaron más fibrosis que los de los animales de control o con hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal y tuvieron más fibrosis los perros con hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal que los animales de control. HAP: hipertensión arterial pulmonar; SR: simpatectomía renal. <sup>a</sup> $p < 0,01$  frente a los grupos control e hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal. <sup>b</sup> $p < 0,01$  frente al grupo de control. Esta figura se muestra a todo color solo en la versión electrónica del artículo.



**Figura 3.** Análisis de *Western blot* de los receptores de angiotensina II tipo 1 y angiotensina II tipo 2 en los extractos de muestras de proteínas procedentes de la arteria pulmonar. A: ejemplos de las bandas de *Western blot* identificadas con los anticuerpos para el receptor de angiotensina II tipo 1. B: densidades medias de las bandas expresadas como proporciones de los tres grupos (grupo de hipertensión arterial pulmonar frente a grupo control y grupo de hipertensión arterial pulmonar + simpatectomía renal). C: ejemplos de las bandas de *Western blot* identificadas con los anticuerpos para el receptor de angiotensina II tipo 2. D: densidades medias de las bandas expresadas como proporciones de los tres grupos; no hubo diferencias significativas en las densidades de angiotensina II tipo 2 de los tres grupos. AT1: angiotensina II tipo 1; AT2: angiotensina II tipo 2; HAP: hipertensión arterial pulmonar; SR: simpatectomía renal. \* $p < 0,01$ .

nervios renales participan en la regulación de la producción de ET-1 por los riñones<sup>30</sup>. Un estudio reciente ha demostrado que la SR previno los aumentos de las concentraciones renales de nora-drenalina y AII inducidos por la insuficiencia aórtica<sup>31</sup>. La infusión

de AII produjo un aumento de la ET vascular que convierte la actividad enzimática y el contenido de ET-1 renal en la rata. Estos resultados indican que la AII es un estímulo intenso para la síntesis de ET-1<sup>32</sup>.

Tiene interés señalar que, en el presente estudio, se observó que la expresión del receptor de AT<sub>1</sub> estaba aumentada en la HAP experimental, pero este cambio quedó anulado tras la SR. El efecto de la AII en la HAP se produce a través de los receptores de AT<sub>1</sub>. De Man et al<sup>6</sup> han demostrado que el aumento de la señalización de los receptores de AT<sub>1</sub> se asoció a un aumento de la proliferación celular en el músculo liso de la arteria pulmonar en los pacientes con HAP en comparación con los controles. Estos datos indican el concepto de que, después de la SR, la actividad sistémica del sistema renina-angiotensina-aldosterona estaba inhibida, y ello daba lugar a una regulación negativa de la expresión de la actividad local del sistema renina-angiotensina-aldosterona y del receptor de AT<sub>1</sub>. Considerados conjuntamente, los resultados obtenidos indican que el tratamiento con SR antes de la inducción de la HAP previno los aumentos de la presión sistólica ventricular derecha y atenuó el engrosamiento de los vasos pulmonares. La influencia de la SR en la HAP se produce principalmente a través de la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona y el sistema de la ET.

### Posible trascendencia

La HAP es una enfermedad rápidamente progresiva que conduce, en última instancia, a la insuficiencia cardíaca derecha y la muerte. Los avances realizados en el conocimiento de la biopatología a lo largo de las últimas dos décadas han conducido a tratamientos dirigidos a revertir la vasoconstricción pulmonar. A pesar de estos avances, la progresión de la enfermedad es frecuente, incluso con el empleo de pautas de tratamiento combinadas que abordan múltiples vías en su mecanismo de acción. Se ha demostrado que la presión arterial pulmonar fue atenuada por la SR en la HAP experimental. La SR puede modificar el remodelado vascular pulmonar al inhibir el sistema renina-angiotensina-aldosterona y la actividad de la ET. Los datos del presente estudio son preliminares, pero la ablación arterial renal puede ser una alternativa efectiva para el tratamiento de los pacientes con HAP. Esta observación podría plantear una preocupación respecto a la patogenia convencional de la HAP e indicar la efectividad de la SR para la HAP, un nuevo concepto similar al del efecto de la denervación arterial pulmonar para el tratamiento de los pacientes con HAP<sup>33</sup>.

### Limitaciones

El presente estudio tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, no se estudió la evolución temporal de las alteraciones hemodinámicas y estructurales inducidas por la DHMC. En consecuencia, no se sabe si el remodelado hemodinámico y estructural se inicia inmediatamente después de la inyección de DHMC y si estas alteraciones son reversibles o no. En segundo lugar, se realizó la simpatectomía renal al mismo tiempo que la inducción farmacológica de la HAP. Por consiguiente, no es posible determinar los efectos de la SR aplicada cuando la HAP está ya bien establecida, como ocurre en el contexto clínico. Sin embargo, los resultados apuntan a que la SR fue eficaz en las fases iniciales de la HAP. En futuros estudios se deberá investigar los efectos de la SR en la HAP establecida. En tercer lugar, en los animales de control y los perros con HAP, el catéter de ablación por radiofrecuencia no se colocó en las arterias renales. Los grupos de control y de HAP no fueron grupos con un tratamiento simulado real. Sin embargo, los resultados obtenidos revelaron que la SR no solo atenuó las alteraciones hemodinámicas, sino que inhibió el remodelado vascular pulmonar. Estos resultados sientan las bases para la realización de un estudio de mecanismo de acción más completo. En cuarto lugar, no se investigó en los animales de control y los tratados con SR la distribución anatómica de los nervios

simpáticos periarteriales alrededor de las arterias mediante tinción de inmunofluorescencia doble con anticuerpos dirigidos a la tirosina hidroxilasa y el péptido relacionado con el gen de calcitonina. No se sabe si se destruyó o no la totalidad del plexo existente alrededor de la arteria renal. Por último, Aguero et al<sup>34</sup> han descrito que el remodelado ventricular derecho fue estructural, histológico y molecular en un modelo de aplicación de la hipertensión pulmonar poscapilar basado en la colocación de una banda en la vena pulmonar. En el presente estudio se observó que el ventrículo derecho presentó unas cifras superiores de aldosterona, péptido natriurético tipo B y fibrosis intersticial en los perros con HAP. Sin embargo, no se investigaron los cambios de la masa ventricular derecha y los cambios moleculares en la HAP experimental producida por DHMC. Será preciso investigar con mayor detalle las alteraciones estructurales y moleculares del ventrículo derecho en la HAP experimental producida por DHMC.

### CONCLUSIONES

La simpatectomía renal inhibió el remodelado vascular pulmonar y redujo la presión arterial pulmonar en la HAP experimental. El efecto de la SR en la HAP puede contribuir a producir la disminución de las concentraciones de neurohormonas.

### FINANCIACIÓN

Este estudio fue financiado por el *National Science and Technology Pillar Program* de China (2011BAI11B12), el *National Key Basic Research Development Program* de China (programa «973», 2012CB518604) y la *National Natural Science Foundation* de China (81070144).

### CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

### BIBLIOGRAFÍA

- Chin KM, Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1527-38.
- Ciarka A, Doan V, Velez-Roa S, Naeije R, Van de Borne P. Prognostic significance of sympathetic nervous system activation in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:1269-75.
- Yamazato Y, Ferreira AJ, Hong KH, Sriramula S, Francis J, Yamazato M, et al. Prevention of pulmonary hypertension by angiotensin-converting enzyme 2 gene transfer. *Hypertension*. 2009;54:365-71.
- Naeije R, Van de Borne P. Clinical relevance of autonomic nervous system disturbances in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2009;34:792-4.
- Velez-Roa S, Ciarka A, Najem B, Vachieri JL, Naeije R, Van de Borne P. Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. *Circulation*. 2004;110:1308-12.
- De Man FS, Tu L, Handoko ML, Rain S, Ruiters G, François C, et al. Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:780-9.
- Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, Olschewski H, Haredza P, Karadas B, et al. Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1488-96.
- Johnson L, Boon J, Orton EC. Clinical characteristics of 53 dogs with Doppler-derived evidence of pulmonary hypertension: 1992-1996. *J Vet Intern Med*. 1999;13:440-7.
- Fontenla A, García-Donaire JA, Hernández F, Segura J, Salgado R, Cerezo C, et al. Manejo de la hipertensión resistente en una unidad multidisciplinaria de denervación renal: protocolo y resultados. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:364-70.
- Kanai T, Krum H. Un tratamiento nuevo para una enfermedad antigua: tratamiento de la hipertensión arterial resistente mediante denervación simpática renal percutánea. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:734-40.
- Zhao QY, Yu SB, Huang H, Tang Y, Xiao J, Dai Z, et al. Effects of renal sympathetic denervation on the development of atrial fibrillation substrates in dogs with pacing-induced heart failure. *Int J Cardiol*. 2013;168:1672-3.

12. Zhao QY, Yu SB, Zou MH, Dai ZX, Wang XL, Xiao JP, et al. Effect of renal sympathetic denervation on the inducibility of atrial fibrillation during rapid atrial pacing. *J Interv Card Electrophysiol*. 2012;35:119–25.
13. Mattocks AR, Jukes R, Brown J. Simple procedures for preparing putative toxic metabolites of pyrrolizidine alkaloids. *Toxicol*. 1989;27:561–7.
14. Tang J, Wang ZT, Zhang M, Teruaki A, Norio N, Masao H. Release and identification of monocrotaline acid from dehydromonocrotaline. *J Chin Pharma Univer*. 2003;34:499–502.
15. Wang X, Zhao Q, Deng H, Wang X, Guo Z, Dai Z, et al. Effects of renal sympathetic denervation on the atrial electrophysiology in dogs with pacing-induced heart failure. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2014;37:1357–66.
16. Lai TS, Cai SX, Guo ZH. Serum and lung endothelin-1 increased in a canine model of ventilator-induced lung injury. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123:1021–7.
17. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S43–54.
18. Wharton J, Davie N, Upton PD, Yacoub MH, Polak JM, Morrell NW. Prostacyclin analogues differentially inhibit growth of distal and proximal human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation*. 2000;102:3130–6.
19. Wensel R, Jilek C, Dörr M, Francis DP, Stadler H, Lange T, et al. Impaired cardiac autonomic control relates to disease severity in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009;34:895–901.
20. Chen SL, Zhang YJ, Zhou L, Xie DJ, Zhang FF, Jia HB, et al. Percutaneous pulmonary artery denervation completely abolishes experimental pulmonary arterial hypertension in vivo. *EuroIntervention*. 2013;9:269–76.
21. Juratsch CE, Jengo JA, Castagna J, Laks MM. Experimental pulmonary hypertension produced by surgical and chemical denervation of the pulmonary vasculature. *Chest*. 1980;77:525–30.
22. Nootens M, Kaufmann E, Rector T, Toher C, Judd D, Francis GS, et al. Neurohormonal activation in patients with right ventricular failure from pulmonary hypertension: relation to hemodynamic variables and endothelin levels. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:1581–5.
23. Rothman A, Wolner B, Button D, Taylor P. Immediate-early gene expression in response to hypertrophic and proliferative stimuli in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1994;269:6399–404.
24. Wang XL, Zhao QY, Huang H, Tang YH, Xiao JP, Dai ZX, et al. Effect of renal sympathetic denervation on atrial substrate remodeling in ambulatory canines with prolonged atrial pacing. *Plos One*. 2013;8:e64611.
25. Hadri L, Kratlian RG, Benard L, Maron BA, Dorfmueller P, Ladage D, et al. Therapeutic efficacy of AAV1.SERCA2a in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2013;128:512–3.
26. Csiszar A, Labinskyy N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, et al. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension*. 2009;54:668–75.
27. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res*. 1993;73:887–97.
28. Cacoub P, Dorent R, Nataf P, Carayon A. Endothelin-1 in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1993;329:1967–8.
29. Nakamura A, Johns EJ. Effect of renal nerves on expression of renin and angiotensinogen genes in rat kidneys. *Am J Physiol*. 1994;266:E230–41.
30. Girchev R, Bäcker A, Markova P, Kramer HJ. Impaired response of the denervated kidney to endothelin receptor blockade in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int*. 2004;65:982–9.
31. Rafiq K, Noma T, Fujisawa Y, Ishihara Y, Arai Y, Nabi AH, et al. Renal sympathetic denervation suppresses de novo podocyte injury and albuminuria in rats with aortic regurgitation. *Circulation*. 2012;125:1402–13.
32. Barton M, Shaw S, D'Uscio LV, Moreau P, Lüscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238:861–5.
33. Chen SL, Zhang FF, Xu J, Xie DJ, Zhou L, Nguyen T, et al. Pulmonary artery denervation to treat pulmonary arterial hypertension: the single-center, prospective, first-in-man PADN-1 study (first-in-man pulmonary artery denervation for treatment of pulmonary artery hypertension). *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:1092–100.
34. Aguero J, Ishikawa K, Hadri L, Santos-Gallego C, Fish K, Hammoudi N, et al. Characterization of right ventricular remodeling and failure in a chronic pulmonary hypertension model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307:H1204–15.