

RICCARDO LACCHINI

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO NO
GENE DA ALDOSTERONA SINTASE E
RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO ANTI-HIPERTENSIVO**

CAMPINAS

Unicamp

2008

RICCARDO LACCHINI

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO NO
GENE DA ALDOSTERONA SINTASE E
RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO ANTI-HIPERTENSIVO**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L117e Lacchini, Riccardo
Estudo de associação entre polimorfismo no gene da aldosterona sintase e resistência ao tratamento anti-hipertensivo. Riccardo Lacchini. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Heitor Moreno Júnior
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipertensão. 2. Aldosterona. 3. Farmacogenética. I. Moreno Júnior, Heitor. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Association study between a genetic polymorphism in aldosterone synthase and resistance to anti-hypertension treatment

Keywords: • Hypertension
• Aldosterone
• Pharmacogenetics

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Prof. Dr. Francisco Fonseca

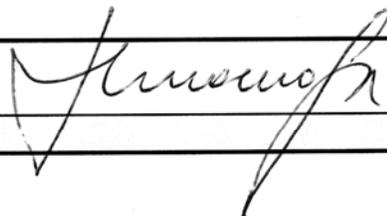
Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Data da defesa: 17-11-2008

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

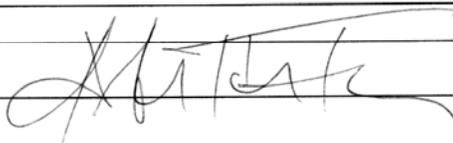
Ricardo Lacchini

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Heitor Moreno Júnior



Membros:

Professor (a) Doutor (a) **Francisco Fonseca**



Professor (a) Doutor (a) **Carmen Silvia Bertuzzo**



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17/11/2008

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha Família.

Meus Pais,
que me deram muito mais que exemplos,
carinho, abrigo.

Eles me deram caráter,
algo muito raro hoje em dia.

Minha Irmã,
que nem imaginava,
me guiou no mundo da ciência
com suas grandes conquistas e
sua dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo apoio e carinho. Só eles têm idéia de todos os obstáculos ultrapassados para chegar até aqui.

Minha mãe, Laura, que sempre ouviu todas as peripécias, dificuldades e pequenas conquistas, e sempre me deu o maior apoio e conselhos.

Meu pai, Corrado, que me deu conselhos inestimáveis, e que certamente tem “culpa” pela minha seriedade e iniciativa; “Guarda il mondo intorno a te”.

Minha irmã, Silvia, que além de exemplo, sempre me recebeu com braços abertos, sempre disposta a me ajudar custe o que custasse.

Agradeço ao professor Heitor Moreno Júnior, pela amizade, pelas longas horas de conversas, conselhos, e pelos ensinamentos; “Coração de Leão, olho de Tigre”.

Agradeço ao professor Alexandre Oliveira, por ter me recebido em seu laboratório. Apreendi com ele muito do que hoje considero o ideal de um cientista.

Agradeço à professora Maricilda Palandi de Melo, por toda a ajuda que me deu, e por também ter me recebido em seu laboratório. Sua participação foi indispensável.

Agradeço ao professor José Eduardo Tanus Santos, pela inestimável ajuda e orientação nos momentos mais difíceis.

Agradeço à doutora Maricene Sabha pela amizade, ajuda nas horas de aperto, e pelas portas que me abriu.

Agradeço à doutora Fernanda Borchers Coeli, pelo carinho, e pelas indispensáveis ajudas no dia-a-dia.

Agradeço à Valéria, por inúmeros galhos quebrados nas horas de necessidade.

Agradeço às alunas do Professor José, Tatiane e Valéria, pela valiosa ajuda que me prestaram.

Agradeço aos colegas dos departamentos de Farmacologia, de Anatomia e do CBMEG, em especial à Lourdes, à Mariana, ao Delano, ao Rafael Rodrigues, ao Fabrício, ao Hugo, ao Amauri, à Renata e à Carolzinha, pelo companheirismo e amizade.

Agradeço aos meus grandes amigos: Júnior, Engel e Finger, que apesar de longe pra caramba, me deram um baita apoio e se mantiveram sempre presentes.

Agradeço ao CNPq, pelo apoio financeiro (bolsa).

Agradeço à FAPESP e CAPES pelo financiamento do projeto.

Agradeço aos pacientes e voluntários que participaram do estudo.

Agradeço ao carinha lá de cima, que mesmo nos momentos de maior azar, me fez ter sorte, e me ajudou a passar ileso por cada uma...

*“Se a vida fosse representada por
uma linha longa e contínua
com seus altos e baixos,
ao olharmos esta linha
à grande distância,
ela seria reta e
perfeitamente nivelada:
tudo na vida se compensa”*

	Pág.
RESUMO	xxxiii
ABSTRACT	xxxvii
1- INTRODUÇÃO	41
1.1- Hipertensão	43
1.2- Hipertensão arterial refratária	45
1.2.1- Adesão ao tratamento.....	47
1.2.2- HAR e prescrição inadequada de fármacos anti- hipertensivos.....	49
1.2.3- Interação com drogas.....	51
1.2.4- Condições associadas.....	52
1.2.5- Importância da sobrecarga volêmica.....	54
1.2.6- Hipertensão arterial secundária.....	55
1.3- Sistema Renina - Angiotensina - Aldosterona	56
1.3.1- Aldosterona e seus efeitos.....	57
1.4- Remodelamento cardiovascular	60
1.4.1- Velocidade de onda de pulso.....	61
1.4.2- Espessura da íntima-média da carótida.....	65

1.5- Fatores Genéticos.....	65
1.5.1- O gene <i>CYP11b2</i>	66
1.5.2- O gene <i>MDR-1</i>	68
2- OBJETIVOS.....	77
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	81
3.1- Características dos pacientes.....	83
3.2- Desenho do estudo.....	83
3.3- Seleção e acompanhamento clínico dos pacientes.....	83
3.3.1- Critérios de inclusão.....	86
3.3.2- Critérios de exclusão.....	86
3.4- Coleta de dados clínicos.....	86
3.5- Medida da pressão arterial.....	87
3.6- Estudo da adesão ao tratamento.....	88
3.6.1- Método da contagem de comprimidos.....	88
3.7- Avaliação laboratorial.....	89
3.8- Avaliação da espessura da íntima-média das carótidas.....	90
3.9- Avaliação da velocidade de onda de pulso.....	91
3.10- Avaliação dos polimorfismos dos genes <i>CYP11b2</i> e <i>MDR-1</i>.....	92

3.10.1- Extração de DNA.....	92
3.10.2- Genotipagem do polimorfismo -344C/T do gene <i>CYP11b2</i>	94
3.10.3- Genotipagem do polimorfismo 3435 C/T do gene <i>MDR-1</i>	99
3.11- Estatística	103
3.11.1- Análise descritiva.....	103
3.11.2- Análise inferencial.....	104
4- RESULTADOS	105
4.1- Frequência genotípica do gene <i>CYP11b2</i>	110
4.1.1- Influência dos alelos sobre parâmetros clínicos.....	112
4.2- Ensaio preliminar da frequência genotípica do gene <i>MDR-1</i>	117
4.2.1- Influência dos alelos sobre parâmetros clínicos.....	119
5- DISCUSSÃO	127
6- CONCLUSÃO	135
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
8- ANEXOS	155

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
B/N	Branco/Negros
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	<i>Ethilenediamine Tetraacetic Acid</i>
EIM	Espessura da Íntima-Média de Carótida
HA	Hipertensão Arterial
HAR	Hipertensão Arterial Refratária
HC-FCM	Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas
HDLc	Colesterol de Lipoproteína de Alta Densidade
IMC	Índice de Massa Corporal
LDLc	Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade
M/F	Masculino/Feminino
MAP	<i>Mitogen-activated Protein</i>
MAPA	Monitorização Ambulatorial de Pressão Arterial
MKP-1	<i>Protein Kinase Phosphatase-1</i>

MR	Receptor Mineralocorticóide
N	Número de Indivíduos
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGP	p-Glicoproteína
PNA	Peptídeo Natriurético Atrial
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
VOP	Velocidade de Onda de Pulso

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Freqüência genotípica do polimorfismo -344C/T do gene <i>CYP11b2</i> em populações diferentes.....	68
Tabela 2 Freqüências alélicas do polimorfismo 3435C/T do gene <i>MDR-1</i> em populações diferentes.....	71
Tabela 3 Fármacos que são substratos, indutores ou inibidores da p-glicoproteína.....	73
Tabela 4 Seleção de fármacos prescritos no ambulatório de farmacologia cardiovascular HC/UNICAMP.....	85
Tabela 5 <i>Primers</i> usados para amplificar o gene <i>CYP11b2</i>	97
Tabela 6 <i>Primers</i> usados para genotipagem do gene <i>MDR-1</i>	102
Tabela 7 Características dos grupos Controle, HT e HAR	108
Tabela 8 Equilíbrio de Hardy-Weinberg do gene <i>CYP11b2</i>	111
Tabela 9 Características dos grupos HT e HAR incluídos para a comparação dos parâmetros clínicos e de remodelamento cardiovascular entre grupos de alelos dos genes <i>CYP11b2</i> e <i>MDR-1</i>	113
Tabela 10 Equilíbrio de Hardy-Weinberg do gene <i>MDR-1</i>	118

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Número de classes necessárias para controlar a PA.....	44
Figura 2 Tendência nos usos de anti-hipertensivos nos anos 90.....	50
Figura 3 Mecanismo de funcionamento do Sistema Renina - Angiotensina - Aldosterona.....	57
Figura 4 Vias de sinalização intra-celular da aldosterona.....	59
Figura 5 Complacência arterial durante a sístole.....	63
Figura 6 Medida da VOP pelo método “foot to foot”.....	64
Figura 7 Principais atuações da PGP.....	70
Figura 8 Esquema representativo do método de avaliação da EIM.....	91
Figura 9 Teste de integridade do DNA.....	93
Figura 10 Representação esquemática de uma reação de PCR.....	95
Figura 11 Região de interesse do gene <i>CYP11b2</i>	96
Figura 12 Digestão dos produtos de PCR do gene <i>CYP11b2</i>	99
Figura 13 Região de interesse do gene <i>MDR-1</i>	101
Figura 14 Genotipagem do gene <i>MDR-1</i>	103
Figura 15 Percentual de pacientes estudados utilizando combinações de até sete classes de anti-hipertensivos diferentes.....	109

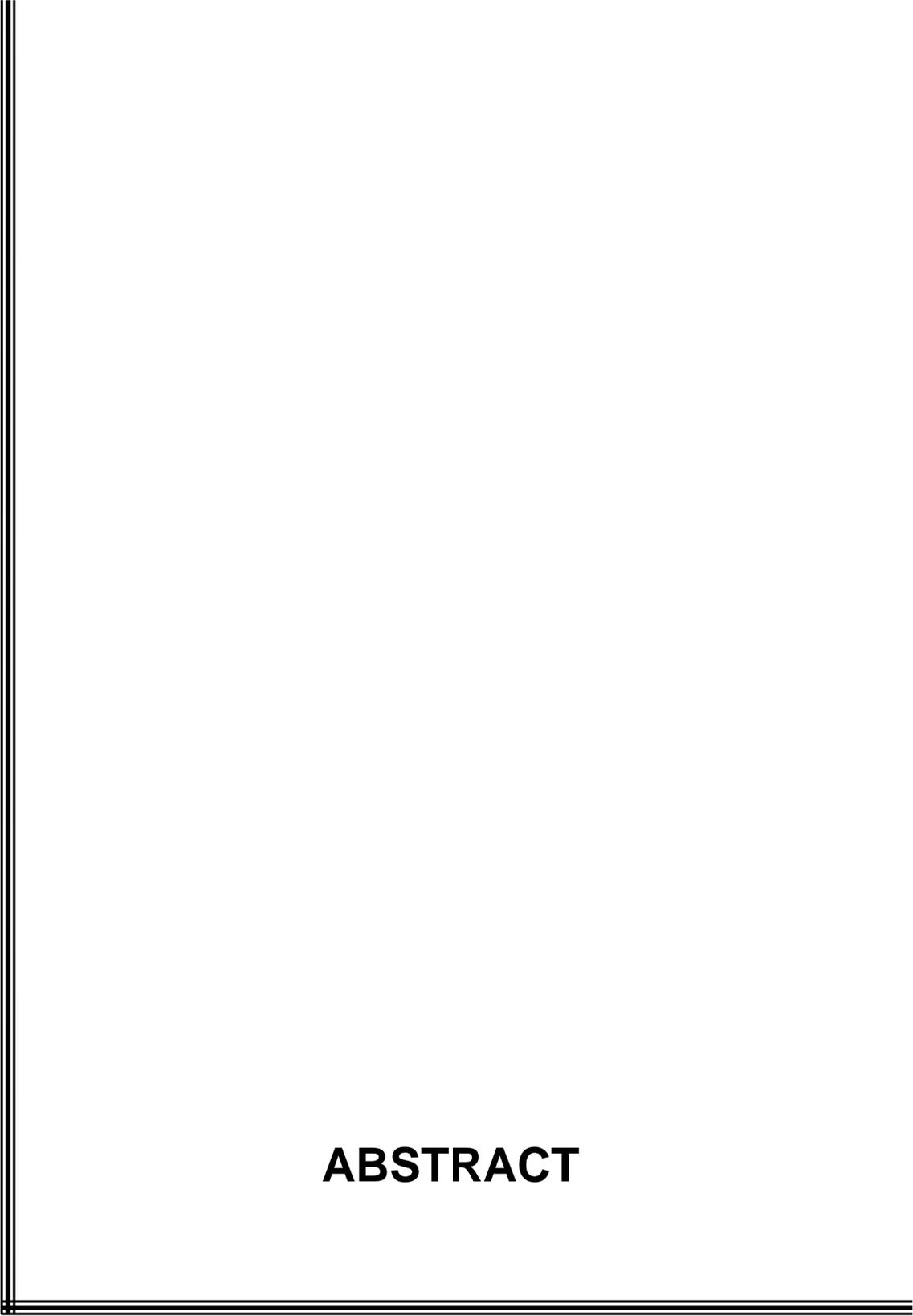
Figura 16	Percentual de pacientes HT e HAR utilizando cada classe de medicamento.....	110
Figura 17	Freqüência genotípica do polimorfismo -344C/T do gene <i>CYP11b2</i> nos grupos controle, HT e HAR.....	111
Figura 18	Freqüência alélica do polimorfismo -344C/T do gene <i>CYP11b2</i> entre os grupos controles, HT e HAR.....	112
Figura 19	Níveis de PAS e PAD entre genótipos do gene <i>CYP11b2</i>	114
Figura 20	Níveis plasmáticos de aldosterona entre genótipos do gene <i>CYP11b2</i>	114
Figura 21	Níveis plasmáticos de renina entre genótipos do gene <i>CYP11b2</i>	115
Figura 22	Níveis plasmáticos de cortisol entre genótipos do gene <i>CYP11b2</i>	115
Figura 23	Valores da EIM entre genótipos do gene <i>CYP11b2</i>	116
Figura 24	Valores de VOP entre genótipos do gene <i>CYP11b2</i>	116
Figura 25	Número de anti-hipertensivos entre genótipos do gene <i>CYP11b2</i>	117
Figura 26	Freqüência genotípica do polimorfismo 3435C/T do gene <i>MDR-1</i> nos grupos controle, HT e HAR.....	118
Figura 27	Freqüência alélica do polimorfismo 3435C/T do gene <i>MDR-1</i>	119

Figura 28	Níveis de pressão arterial sistólica e diastólica entre os grupos de genótipos do gene <i>MDR-1</i>	120
Figura 29	Níveis de pressão arterial sistólica e diastólica entre os grupos de genótipos (apenas pacientes HT).....	121
Figura 30	Níveis de pressão arterial sistólica e diastólica entre os grupos de genótipos (apenas pacientes HAR).....	121
Figura 31	Níveis plasmáticos de aldosterona entre os genótipos do gene <i>MDR-1</i>	122
Figura 32	Níveis plasmáticos de renina entre os genótipos do gene <i>MDR-1</i>	123
Figura 33	Níveis plasmáticos de cortisol entre genótipos do gene <i>MDR-1</i>	123
Figura 34	Valores da EIM entre genótipos do gene <i>MDR-1</i>	124
Figura 35	Valores de VOP entre genótipos do gene <i>MDR-1</i>	124
Figura 36	Número de anti-hipertensivos entre genótipos do gene <i>MDR-1</i>	125

RESUMO

Introdução: Hipertensão Refratária se caracteriza por quadro de hipertensão concomitante ao uso de 3 classes diferentes de anti-hipertensivos, sendo, pelo menos um destes, diurético. Existem fatores genéticos que influenciam mecanismos de controle da pressão arterial, podendo ter papel importante na hipertensão refratária. O sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona desempenha um papel central na gênese da hipertensão. Isto torna interessante o estudo das influências genéticas sobre sistemas envolvidos com a produção e transporte da aldosterona. Este trabalho apresenta o estudo de um polimorfismo na região promotora do gene *CYP11b2* (troca de timina por citosina na posição -344 do gene), que codifica a aldosterona sintase, enzima responsável pelo último passo na síntese de aldosterona pelas glândulas supra-renais. Secundariamente, o trabalho apresenta o estudo de um polimorfismo no exon 26 do gene da p-glicoproteína (troca de citosina por timina na posição 3435 do gene). Esta proteína está envolvida com resistência a diversos medicamentos na terapêutica (o gene é chamado *Muliple Drug Resistance-1*, *MDR-1*), e recentemente foi associada a alterações na excreção e captação tecidual de aldosterona. **Objetivos:** O estudo visa determinar se existe associação entre o alelo T do polimorfismo -344C/T no gene *CYP11b2* e a resistência ao tratamento anti-hipertensivo. Secundariamente, é avaliada, de maneira preliminar, a participação do alelo C do gene *MDR-1* no fenótipo de hipertensão refratária. **Materiais e Métodos:** Foram avaliados 340 indivíduos, dos quais 88 eram portadores de HAR que preencheram os requisitos de inclusão no estudo, 142 indivíduos eram hipertensos moderados e responsivos a tratamento farmacológico (HT). Os demais indivíduos (n = 110) constituíram o grupo controle. Foram coletadas amostras de sangue para exames laboratoriais (dentre eles, quantificação de aldosterona, cortisol, renina) e extração de DNA. Foi medida a espessura da íntima média de carótida (EIM) dos pacientes através de ultra-som. Foi estimada a Velocidade de Onda de Pulso carótida-femural (VOP) dos pacientes. O DNA foi extraído pelo método de *Salting Out*. O polimorfismo do gene *CYP11b2* foi genotipado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) seguido por digestão enzimática com a enzima *Hae-III*. O polimorfismo do gene *MDR-1* foi

genotipado através de PCR alelo específico. **Resultados:** Foi encontrada associação do alelo T do gene *CYP11b2* com Hipertensão ($p < 0,05$), porém não houve diferença entre os grupos hipertensos responsivos e hipertensos resistentes. Não houve diferença estatística nas concentrações plasmáticas de aldosterona, cortisol e renina; EIM e VOP nos grupos de alelos C e T. Não foi encontrada relação entre a distribuição alélica do gene *MDR-1* e hipertensão tratada ou resistente. Foi detectada associação significativa entre alelo C do gene *MDR-1* e pressão arterial diastólica (PAD) aumentada em hipertensos refratários. **Conclusões:** há associação entre o alelo T do gene *CYP11b2* e hipertensão, mas não há associação com resistência farmacológica aos anti-hipertensivos. Não houve influência do alelo T sobre parâmetros clínicos e de remodelamento vascular. O alelo C do gene *MDR-1* parece estar associado a uma maior PAD no grupo de hipertensos refratários.



ABSTRACT

Introduction: Resistant hypertension is characterized by elevated blood pressure concurrent with the use of 3 different anti-hypertensive drugs, being one of them a diuretic. There are genetic factors that interfere in the arterial pressure control system and may have a significant role in resistant hypertension. Renin-Angiotensin-Aldosterone System plays a major role in hypertension genesis, therefore the systems that control the production and transport of aldosterone are interesting targets for genetic association studies. This work presents the study of a polymorphism (-344 C/T) in *CYP11b2* gene. This gene translates aldosterone synthase, an enzyme responsible for endogenous synthesis of aldosterone on adrenal glands. A secondary study on a polymorphism (3435C/T) in *MDR-1* gene was performed. This gene translates p-glicoprotein, an efflux-pump related to several drug resistance phenotypes. Recently it was reported that tissue uptake and excretion of aldosterone is mediated by p-glicoprotein. **Objectives:** The study aims to evaluate the association between allele T of *CYP11b2* and resistance to anti-hypertension treatment. As a second objective it has been performed an initial evaluation of the influence of C allele of *MDR-1* on resistant hypertension phenotype. **Materials and Methods:** In this study, 340 subjects were evaluated: 88 patients presented Refractory Arterial Hypertension (RAH), 142 were responsive to anti-hypertension treatment (RT), and the remaining was the control group (n=110). Blood samples were collected for laboratory examinations (plasmatic aldosterone, cortisol, renin) and DNA extraction. It was examined the carotid intima-media thickness (IMT) using ultra-sound, and carotid-femoral pulse wave velocity (PWV). DNA was extracted using the salting out method. *CYP11b2* genotyping was performed through restriction fragment length polymorphism (polymerase chain reaction (PCR) followed by endonuclease digestion). PCR products were digested with *Hae III* enzyme. *MDR-1* genotyping was performed through allele specific PCR. **Results:** It was found association between allele T of *CYP11b2* and hypertension ($p < 0,005$), but no difference has been detected between RT and RAH groups. No statistical difference was detected in plasmatic aldosterone, cortisol and renin concentrations, neither in PWV nor in IMT when compared C and T allele groups. It was found no relationship between allele

C of *MDR-1* and hypertension, treated or resistant, although there was a significant association between allele C of this gene and elevated diastolic blood pressure in the RAH group. **Conclusions:** There is association between allele T of *CYP11b2* gene and hypertension, but there is no relationship with pharmacological resistance to antihypertensive treatment. No influence was detected of allele T regarding clinical parameters or remodeling indicators. Allele C of *MDR-1* gene seems to be associated with an elevated diastolic blood pressure in resistant hypertensive subjects.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Hipertensão

Hipertensão é um dos problemas de saúde mais importantes na atualidade e existem grande morbidade e mortalidade associadas a ela. A pressão arterial elevada está associada a maior prevalência de doenças cardíacas, doenças renais e mortalidade aumentada (1, 2).

A hipertensão é capaz de aumentar o risco para uma série de eventos secundários, associados em grande parte à sua morbidade e mortalidade. Dentre estes podemos citar o acidente vascular cerebral, hipertrofia ventricular esquerda, nefro esclerose, e dissecção da aorta abdominal. Além disso, existem doenças decorrentes de aterosclerose que estão indiretamente associadas à hipertensão: doença arterial coronariana obstrutiva, doença vascular cerebral isquêmica, doença arterial obstrutiva de carótidas e extremidades (2).

A hipertensão é diagnosticada, quando há ocorrência de duas ou mais tomadas da pressão arterial sistólica (PAS) em duas visitas consecutivas, com valor maior ou igual a 140 mmHg; ou quando a média da pressão arterial diastólica (PAD) entre duas visitas é maior que 90mmHg. Quando há observação de PAS maior ou igual a 140mmHg e a PAD menor que 90mmHg, se dá o diagnóstico de hipertensão arterial sistólica isolada (3-6).

O aumento da pressão arterial se dá basicamente por três mecanismos: aumento da resistência vascular periférica, aumento da contratibilidade cardíaca e aumento do volume plasmático. As estratégias para o tratamento da hipertensão incluem tratamento não farmacológico (dieta, exercício, abstinência ao álcool e nicotina, dentre outros), e tratamento farmacológico. Podemos citar exemplos de tratamentos farmacológicos para cada “mecanismo” de hipertensão: vasodilatadores (por exemplo, doadores de óxido nítrico) para diminuição aguda da resistência vascular periférica; bloqueadores de canal de cálcio contra o aumento da contratibilidade cardíaca; diuréticos contra o aumento de volume plasmático.

Em torno de 46% dos pacientes hipertensos respondem bem à monoterapia farmacológica (7), sendo indicado para os demais pacientes, as combinações de classes de anti-hipertensivos. Na figura 1 podemos ver a evolução ao longo dos anos 90 nas proporções de pacientes com a pressão arterial controlada usando um ou mais medicamentos.

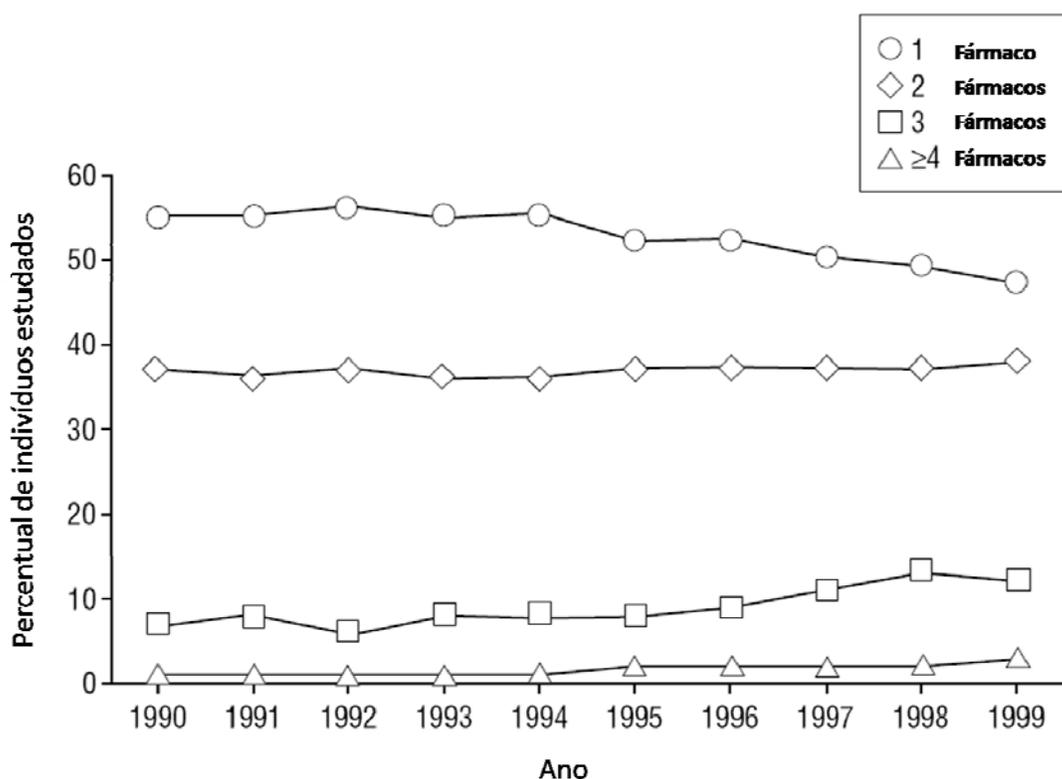


Figura 1- Número de classes necessárias para controlar a PA. Proporção ao longo dos anos 90, de pacientes cuja pressão arterial foi controlada com um a quatro fármacos anti-hipertensivos diferentes. Neste estudo foram incluídos adultos com mais de 65 anos, recrutados em centros de saúde nos Estados Unidos. Em cada ano, o número de indivíduos estudados foi 1795, 1805, 1757, 2089, 1992, 1989, 1886, 1836, 1706, e 1623, respectivamente, totalizando 5888 indivíduos. Os pacientes foram avaliados anualmente durante um período entre 1989 e 1999. Adaptado de (Psaty, Manolio et al., 2002)

É interessante notar que a não adesão ao tratamento, interações farmacológicas, e outros fatores (abordados a seguir) podem contribuir para o insucesso da terapêutica.

1.2- Hipertensão refratária

A Hipertensão Arterial Refratária (ou Resistente) (HAR) é definida como a falha em alcançar a meta ideal dos níveis pressóricos, menores que 140/90 mmHg (130/80 em diabéticos), em pacientes com adesão total ao tratamento anti-hipertensivo, utilizando-se doses máximas de 3 classes diferentes de fármacos anti-hipertensivos, sendo preferencialmente um destes, diurético (8, 9). Também é considerada hipertensão refratária a pressão arterial controlada com 4 medicamentos ou mais (9). Entre 1988 e 1991 apenas 29% dos pacientes sob tratamento tinham sua meta pressórica atingida, e até 1994, houve um declínio, para 27% (7). Um estudo recente traz dados mais alarmantes, com apenas 53% do total de hipertensos tratados com níveis de pressão arterial abaixo de 140/90 mmHg (10). É importante, porém o discernimento entre hipertensão não controlada e hipertensão refratária, sendo que o primeiro grupo inclui tanto indivíduos que não tem controle de sua PA por falta de aderência ao tratamento, como os indivíduos que são realmente resistentes ao tratamento farmacológico(9). Apesar disto, no estudo ALLHAT (11), aproximadamente 50% dos participantes precisaram utilizar 3 medicamentos diferentes para controlar sua PA, o que fica no limite do diagnóstico de HAR. Outra questão interessante foi levantada pelo estudo Framingham (12); foi observado que 90% dos pacientes tiveram a PAD controlada contra apenas 49% com a PAS controlada. Isto mostra uma disparidade no controle da PAS e PAD, principalmente em indivíduos com idade avançada.

A maior parte das causas de controle inadequado da pressão arterial, como postulado pelo VII JNC (8) são hoje consideradas causas de pseudo-refratariedade ou de hiperreatividade transitória da pressão arterial.

As causas de pseudo-refratariedade da hipertensão arterial são múltiplas, sendo as mais freqüentes a não adesão ao tratamento, a hipertensão secundária e as co-morbidades (obesidade, etilismo e apnéia do sono, principalmente). Além disto, torna-se necessário excluir algumas possibilidades antes que seja atribuído a um paciente o diagnóstico de hipertensão refratária, sendo elas: a medida inadequada da pressão arterial, a presença no paciente de artérias braquiais calcificadas, ou ateroscleróticas, e o chamado “efeito do jaleco branco” caracterizado por aferições altas transientes que não refletem a pressão arterial média diurna (9), de forma que devem ser consideradas as medidas ambulatoriais de pressão arterial (MAPA) para fins de diagnóstico. É estimado que o efeito de jaleco branco ocorra entre 20 e 30% do total de hipertensos(13, 14)

Outras causas estão relacionadas a características farmacodinâmicas e farmacocinéticas de anti-hipertensivos inadequadamente utilizados ou associados, ou mesmo não empregados (diuréticos) (15). Nesse contexto, também o tabagismo destaca-se como causa de dificuldade no controle da pressão arterial na vigência de tratamento adequado e em condições ideais.

A resistência à terapia anti-hipertensiva é usualmente multifatorial. Entretanto, erro diagnóstico (pseudo-hipertensão) e descumprimento da prescrição médica (não adesão) são fatores que têm um papel importante na caracterização da HAR. Excluídas as causas secundárias de HA e co-morbidades como obesidade, tabagismo, etilismo, apnéia do sono, além de combinações inadequadas de fármacos anti-hipertensivos e ou subdosagens dos mesmos, outras causas devem ainda ser investigadas, como, por exemplo, a expansão do volume plasmático como mediador da resistência à terapia (16-20).

Assim, mesmo afastadas todas as causas de pseudo-resistência, a HAR é freqüente na prática clínica e permanece sendo um desafio para a medicina. Na chamada pseudo-hipertensão, há discordância entre os valores pressóricos obtidos na avaliação com manguito braquial (os quais se encontram elevados) e os registrados de forma invasiva, através de cateterismo intra-arterial (invariavelmente menores). As causas mais comuns associadas a esta situação

são: aterosclerose arterial difusa e ou hiperplasia da camada média das artérias (21). A manobra de Osler pode ser realizada como primeira triagem. Consiste em insuflar o manguito braquial acima da PAS e palpar simultaneamente a artéria radial que permanece como um cordão endurecido e não compressível, caracterizando a manobra de Osler positiva (22). É discutível sua real validade no diagnóstico de pseudo-hipertensão. Outras manobras podem ser realizadas. Dispositivos não-invasivos de mensuração da PA podem ser utilizados (23). Destes, os equipamentos que usam métodos oscilométricos apresentam maior aproximação com os valores obtidos de forma invasiva por cateterismo intra-arterial, auxiliando na diferenciação entre pseudo-resistência ou pseudo-hipertensão e HAR verdadeira (24).

A falha em atingir os níveis pressóricos é distinta da resistência ao tratamento, de forma que para um regime terapêutico ter falhado, é necessário que tenha sido corretamente seguido (9). Esta distinção é importante clinicamente, pois indivíduos com baixa adesão ao tratamento não necessariamente terão que passar por sucessivas alterações no regime terapêutico como ocorre em indivíduos não responsivos (9).

1.2.1- Adesão ao tratamento

A adesão ao tratamento é definida como o grau de obediência do paciente à prescrição e às instruções médicas. Isto é, como o paciente cumpre as recomendações médicas, em termos de tomar a medicação prescrita, seguir a dieta, realizar mudanças no estilo de vida e comparecer às consultas médicas, coincidindo com a orientação médica estipulada (25).

A falta de adesão ao tratamento anti hipertensivo é uma das principais causas para a falta de controle da pressão arterial (26). Estudos indicam que em torno de 40% dos pacientes que recebem o diagnóstico de hipertensão descontinuam seu tratamento anti-hipertensivo durante o primeiro ano do

tratamento, e menos de 40% persistem no tratamento após 5 a 10 anos de seguimento (27-29)

Vários fatores exercem influência na adesão do paciente ao tratamento anti-hipertensivo. Estes fatores podem ser relacionados:

- 1- Ao paciente: sexo, idade, etnia, estado civil, escolaridade e nível socioeconômico;
- 2- À doença: cronicidade, ausência de sintomas e ou conseqüências tardias;
- 3- Aos hábitos de vida e culturais: a percepção da seriedade do problema, ignorância, experiência com a doença, contexto familiar conceito saúde-doença e auto-estima;
- 4- Ao tratamento: custo, efeitos colaterais, esquemas terapêuticos complexos e qualidade de vida;
- 5- Aos aspectos institucionais: política de saúde, acessos ao serviço público, distância, tempo de espera e tempos de atendimento (30);
- 6- Aos membros da equipe de saúde que assistem o hipertenso, especialmente, a relação médico-paciente que constitui fator de grande importância na adesão do hipertenso ao tratamento (31).

Desta forma, o controle inadequado da PA pode estar relacionado à falta de adesão, um simples, mas importante determinante do tratamento anti-hipertensivo e não a refratariedade, devendo, portanto, ser minuciosamente avaliado e excluído na caracterização da HAR.

1.2.2- Hipertensão arterial refratária e prescrição inadequada de fármacos anti-hipertensivos

Uma revisão de HAR, realizada em centro terciário de atendimento médico por Yakovlevitch e Black da Universidade YALE (32) mostrou que a dosagem sub-terapêutica de anti-hipertensivos foi a causa mais freqüente de resistência ao tratamento medicamentoso (43% dos casos). A otimização das doses destes medicamentos, e particularmente o uso de diuréticos por via oral, permitiu controlar a PA dos pacientes referendados como refratários. Demonstrou-se, desta forma, que existe certa relutância por parte dos clínicos em prescrever diuréticos em doses apropriadas, a despeito das evidências, mostrando a importância do controle do fluído extracelular e do volume sanguíneo no tratamento da HA. Alguns pacientes são especialmente suscetíveis a determinados medicamentos, manifestando efeitos colaterais que levam a intolerância ao fármaco e abandono do tratamento, sendo eventualmente rotulados como hipertensos refratários.

Psaty e colaboradores reportaram um baixo uso de diuréticos e beta-bloqueadores nos anos 90, o que contribuía para o insucesso terapêutico (7). Além disso, eles ressaltam a importância do uso de diuréticos, mesmo em baixas doses, que além de diminuir a pressão arterial, estariam relacionados a menor risco de desfechos cardiovasculares. Isto também é importante, uma vez que o excesso de volume plasmático é apontado como uma das principais causas da hipertensão refratária. Na figura 2, podemos ver as mudanças ao longo dos anos 90 no uso das classes de anti-hipertensivos.

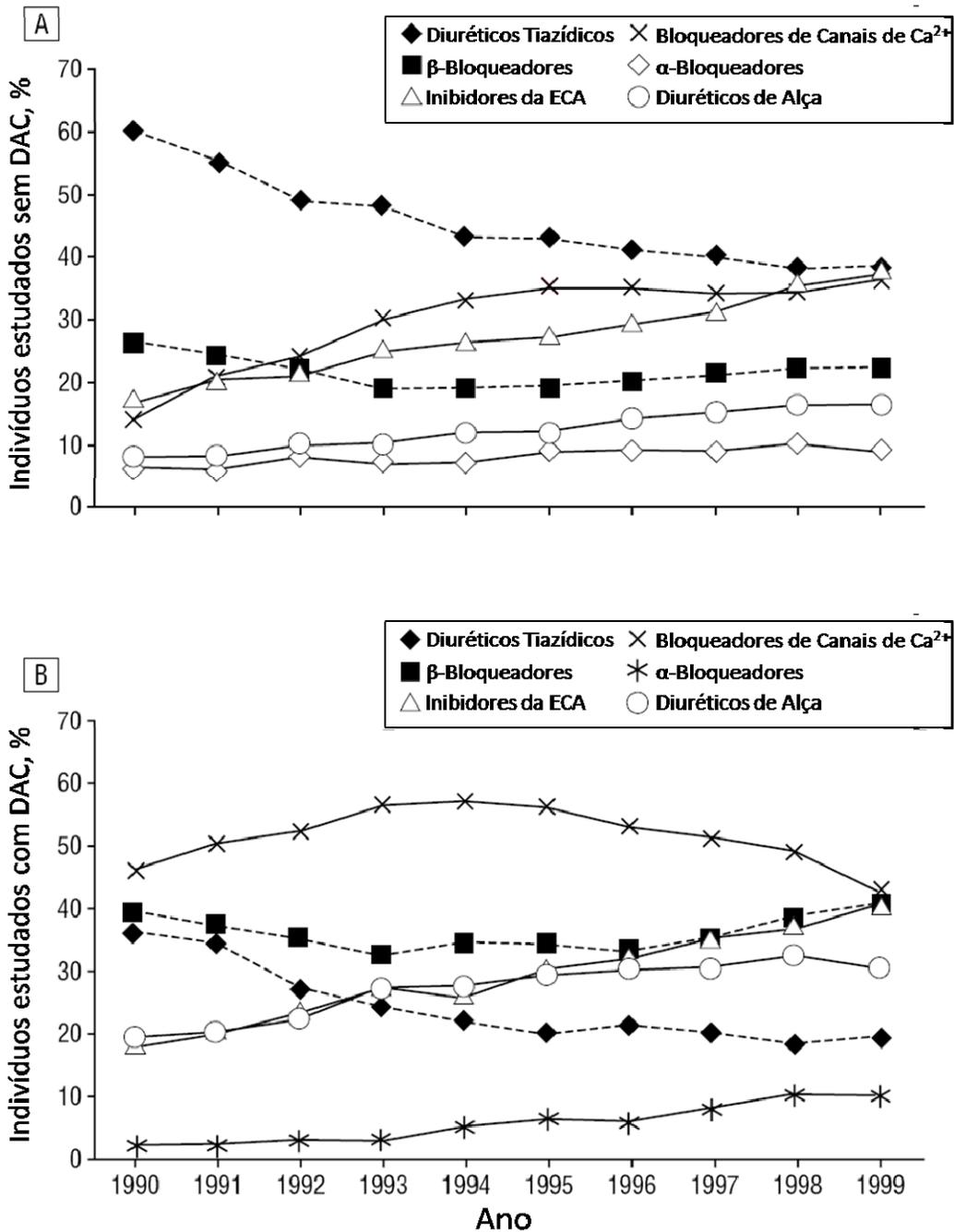


Figura 2- Tendências nos usos de anti-hipertensivos durante os anos 90. Neste estudo foram incluídos 5888 adultos com mais de 65 anos, recrutados em centros de saúde nos Estados Unidos. Os pacientes foram avaliados anualmente durante um período entre 1989 e 1999. **A:** pacientes sem doença da artéria coronária; **B:** Pacientes com doença da artéria coronária. Adaptado de (Psaty, Manolio et al., 2002).

1.2.3- Interações com drogas

Os antiinflamatórios não esteroidais causam retenção de sódio, aumento da volemia, inibição dos efeitos das prostaglandinas vasodilatadoras em nível renal e aumento da resposta vasoconstritora aos hormônios vasopressores e, desta forma, elevam a PA (9).

Alguns estudos de metanálise demonstraram que os antiinflamatórios elevam a PA média em aproximadamente 4 a 5 mmHg. Apenas a aspirina não participa desta importante interação medicamentosa (33). O mecanismo pelo qual ocorreria este aumento na PA seria por inibição da síntese de prostaglandinas pelo rim, especialmente as prostaglandinas E_2 e I_2 , o que levaria a uma retenção de sódio e conseqüentemente de água (9). Os contraceptivos orais provocam Hipertensão Arterial (HA) duas a três vezes mais freqüentemente em mulheres que os usam (34, 35), especialmente em obesas e tabagistas. A suspensão do uso desses medicamentos normaliza a PA em alguns meses.

O uso de cocaína e anfetamina deve ser considerado em todos os pacientes que se apresentam nas unidades de emergência com problemas relacionados à hipertensão arterial (36). A intoxicação aguda por anfetamina é similar àquela da cocaína, porém, mais prolongada podendo durar várias horas. Em pacientes em uso de beta-bloqueadores, a anfetamina ocasiona aumento paradoxal da PA, bem como vasoconstrição coronariana, devido à exagerada estimulação das catecolaminas sobre os alfa-receptores adrenérgicos não bloqueados (37).

As aminas simpatomiméticas, substâncias vasoativas como fenilpropanolamina, efedrina e oximetazolina, presentes em descongestionantes nasais, quando usados por períodos prolongados podem causar aumento da PA ou interferir com a ação das drogas anti-hipertensivas. Os efeitos das aminas simpatomiméticas resultam da atividade agonista alfa-adrenérgica pela estimulação direta de receptores adrenérgicos, e indireta pela facilitação da liberação de noradrenalina dos estoques neuronais (38).

Os antidepressivos tricíclicos antagonizam os efeitos hipotensores das drogas bloqueadoras adrenérgicas (por exemplo, a guanetidina) por impedirem a captação dessas drogas anti-hipertensivas em terminações nervosas adrenérgicas. Interações similares também são observadas com clonidina e metildopa (39). A ciclosporina tem efeito conhecido sobre a PA com relatos de desenvolvimento de hipertensão arterial em 50 a 70% dos pacientes transplantados. Vasoconstrição renal e diminuição da excreção de água são observadas em pacientes com HA induzida pela ciclosporina. Os corticóides promovem retenção de sal e água e HA volume dependente, por apresentarem atividade mineralocorticóide (9, 40).

1.2.4- Condições associadas

Desde o início do século XX, estudos epidemiológicos têm demonstrado associação entre HA e consumo de álcool, sendo considerada uma causa comum de elevação reversível da PA. A contribuição do álcool sobre a prevalência de HA na população varia de acordo com a quantidade ingerida e da população em estudo. O consumo de doses maiores que 30 ml de etanol por dia está relacionado a aumento da pressão arterial (41). Os efeitos do álcool sobre a PA, aparentemente não são mediados por alterações estruturais, e sim por mudanças vasculares funcionais reversíveis, com participação do sistema nervoso simpático, substâncias vasoativas e alterações do transporte celular de eletrólitos. A resistência à terapia anti-hipertensiva também tem sido relacionada ao consumo de álcool, por interferência direta sobre os efeitos das drogas hipotensoras ou associadas à pseudo-resistência ocasionada pela má adesão ao tratamento observada em alcoólatras (42).

O ato de fumar um cigarro causa elevação transitória da PA, sendo a duração do efeito na elevação dos níveis pressóricos influenciada pelo número de cigarros consumidos por dia. Estudos experimentais em humanos e animais têm demonstrado que o mecanismo pelo qual o tabagismo promove estas alterações

está associado ao efeito da nicotina sobre a liberação de catecolaminas neuronais e das supra-renais, os quais aumentam a frequência cardíaca, volume sistólico, contratilidade miocárdica, promovem vasoconstrição sistêmica e aumento de fluxo para musculatura esquelética. A nicotina atua sobre o eixo hipotálamo-hipófise estimulando a secreção do fator liberador de corticotrofina, aumenta os níveis de endorfina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (43), vasopressina e corticosteróides proporcionalmente à concentração plasmática alcançada (44). Outro importante efeito da nicotina sobre o sistema cardiovascular é relacionado à alteração da função endotelial demonstrada em estudos de complacência venosa de veia dorsal da mão em tabagistas (45). Também a administração de nicotina transdérmica (adesivos) em não tabagistas ou tabagistas de grau leve pode causar disfunção endotelial (46-48). Desta forma, o tabagismo está associado à elevação persistente da pressão arterial e aumento da variabilidade pressórica (49-51). Além disso, os efeitos da terapia anti-hipertensiva com betabloqueadores encontram-se atenuados em hipertensos tabagistas (52).

Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que o excesso de peso eleva a PA. O mecanismo exato pelo qual a obesidade provoca esta alteração não está totalmente esclarecido. Sabe-se que obesidade está associada a aumento do débito cardíaco, resistência vascular periférica e fluxo sanguíneo regional, que promovem expansão do volume extracelular e alteração da função renal, manifestada por alteração da curva pressão/natriurese e retenção renal de sódio. Inicialmente, por um aumento da reabsorção tubular na fase inicial da obesidade, e posteriormente, secundária a lesão glomerular com perda de função (53, 54). Outro importante fator é a atividade plasmática da renina que está aumentada em obesos, independente da retenção de sódio e aumento do volume extracelular. O papel da angiotensina II é reforçado pela eficácia observada no tratamento de jovens obesos hipertensos com inibidores da enzima conversora de angiotensina (55).

Pacientes obesos com hipertensão de difícil controle, também exibem maior grau de resistência insulínica, obesidade centrípeta e hipertrofia das fibras músculo-esqueléticas quando comparados a hipertensos bem controlados

pareados por idade, sexo e índice de massa corporal (56). Isto sugere que a hipertrofia do músculo liso dos vasos de resistência induzida pela insulina seja responsável pelo aumento da resistência vascular periférica em pacientes obesos com resistência à insulina e HA. Finalmente, a obesidade e a hiperinsulinemia bloqueiam a efetividade das drogas anti-hipertensivas, contribuindo desta maneira para resistência ao tratamento medicamentoso da HA.

A apnéia obstrutiva do sono deve ser considerada como causa de HAR em todo paciente obeso que apresenta episódios de apnéia durante o sono. Tem sido documentado, que mais de 40% dos pacientes com HAR são portadores de apnéia obstrutiva do sono não diagnosticada (57). O MAPA-24h mostra que estes pacientes não apresentam descenso noturno com a variação do ritmo circadiano e a monitorização do sono confirma a presença de vários episódios de apnéia e hipóxia durante o sono caracterizando o quadro (Smith, Niedermaier et al., 1996). As alterações hemodinâmicas agudas que ocorrem durante a apnéia obstrutiva do sono incluem: hipertensão sistêmica e pulmonar, aumento da pré-carga ventricular esquerda e direita, e diminuição do débito cardíaco.

1.2.5- A importância da sobrecarga volêmica

Um dos principais fatores determinantes da PA e da composição aquosa do corpo é o equilíbrio entre a ingestão oral e a excreção renal e perda extra-renal de água, regulados pelo sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), peptídeo natriurético atrial e os receptores atriais e renais de pressão (58). A sobrecarga de volume que acompanha um balanço positivo de sódio corporal representa uma importante causa de HAR. Várias situações comuns estão associadas a esta condição, como por exemplo, a excessiva ingestão de sal levando a elevação da PA em pacientes hipertensos recebendo medicação anti-hipertensiva. Quando a sobrecarga de volume é provável, a avaliação da excreção de sódio na urina de 24 h nos permite descartar uma falsa restrição salina informada pelo paciente.

1.2.6- Hipertensão arterial secundária

A resistência ao tratamento anti-hipertensivo em pacientes com boa adesão chama a atenção para o diagnóstico de HA secundária. Entre as várias causas de HA secundária existentes e descritas na literatura (59), as mais freqüentemente encontradas em serviços de atendimento especializado são descritas abaixo.

A estenose da artéria renal é a causa tratável mais comum de HA secundária, e deve ser suspeita diagnóstica em indivíduos com história recente de hipertensão, ou hipertensos que não respondem a um tratamento que anteriormente controlava a PA. O renograma com captopril e o ultra-som Doppler de artéria renal são procedimentos de boa sensibilidade para detecção de estenose da artéria renal de grau importante. A angio-ressonância após injeção de gadolínio tem sido indicada para visualização da aorta e das artérias renais, reservando-se a angiografia para estudos com indicação de intervenção transluminal com ou sem implante de endopróteses (60).

Atualmente, admite-se que o hiperaldosteronismo primário seja responsável por cerca de 5-15% dos casos de HA secundária. Entretanto, mais de 30% dos pacientes com hiperaldosteronismo primário apresentam HAR, muitos deles sem hipopotassemia (61). As duas principais causas de hiperaldosteronismo primário são a hiperplasia adrenal idiopática e o adenoma produtor de aldosterona, sendo maior a prevalência de hiperplasia adrenal idiopática entre homens (proporção 4:1), negros e após a sexta década de vida. Adenomas são mais comuns em mulheres (proporção de 2:1), entre 30-50 anos de idade. A concentração plasmática de aldosterona, e a relação entre este fator e a atividade da renina plasmática são testes úteis para triagem, mas não selam o diagnóstico. O diagnóstico é feito através da quantificação da aldosterona urinária de 24h. A tomografia computadorizada com contraste, apesar de útil não detecta cerca de 50% dos adenomas, sendo a dosagem de aldosterona da veia supra-renal considerada o padrão-ouro para determinar a lateralidade da doença (62). O tratamento é cirúrgico nos casos de adenoma, e essencialmente clínico nos casos de hiperplasia (63).

Existem outras causas secundárias de Hipertensão como, feocromocitoma, síndrome de cushing, hiperparatireoidismo e tumores intracranianos que são mais raras, porém também pode estar relacionadas à HAR (9).

1.3- Sistema Renina - Angiotensina - Aldosterona

O SRAA tem uma importante influência sobre a função e estrutura do leito arterial, assim como na regulação da pressão arterial. Alterações tanto na função como na expressão de proteínas envolvidas neste sistema podem levar a um desequilíbrio, e em última análise, poderiam participar na gênese da hipertensão. Na figura 3 podemos ver um esquema do sistema SRAA.

Níveis altos de aldosterona são relacionados à maior velocidade de onda de pulso (VOP) em hipertensos (64). A velocidade de onda de pulso é uma técnica usada para quantificar o espessamento de artérias (abordada a seguir). Além disso, pacientes com aldosteronismo primário - com excesso de produção de aldosterona - possuem maior espessamento da intima-média da carótida, comparado com controles e hipertensos primários (65). Nosso grupo também encontrou relação entre espessura cardíaca aumentada e hipertensão refratária (66). Sabe-se também que estes efeitos secundários à hipertensão (remodelamento cardiovascular) podem ser reduzidos por antagonistas de receptores de aldosterona (67, 68).

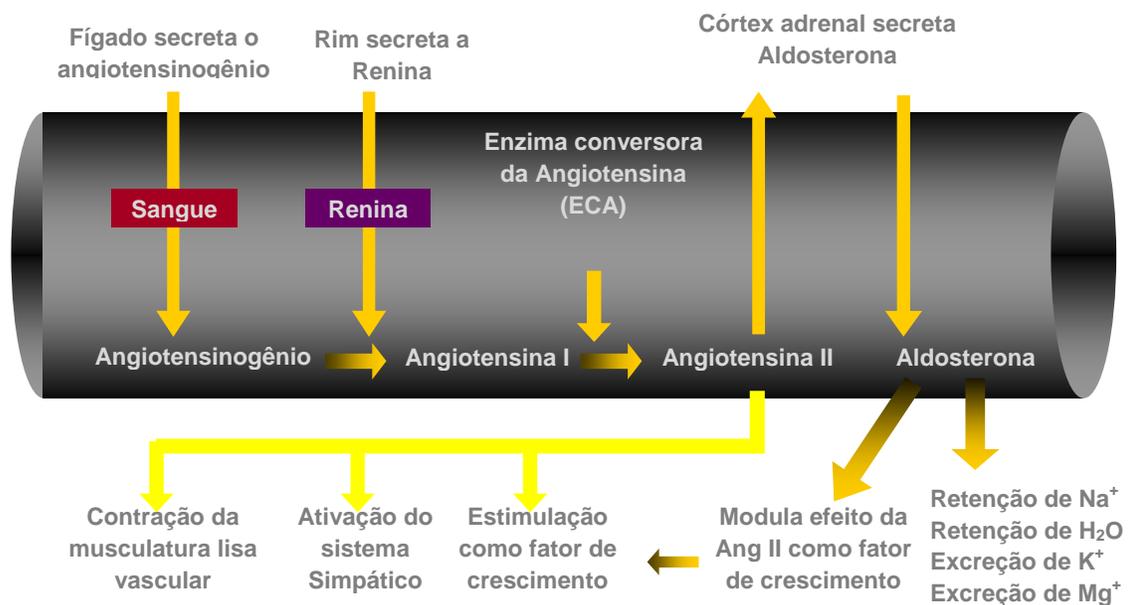


Figura 3- Mecanismo de funcionamento do sistema RAAS: O fígado secreta o angiotensinogênio, que é quebrado pela renina em angiotensina I. Esta é quebrada pela ECA em angiotensina II. A angiotensina II estimula a secreção de aldosterona, causa vasoconstrição e ativação do sistema nervoso simpático (efeitos rápidos). A aldosterona por sua vez retém sódio e água. Angiotensina II e aldosterona promovem a proliferação de células de musculatura lisa de vasos (efeito lento) e, conseqüentemente, promovem também o espessamento arterial.

1.3.1- Aldosterona e seus efeitos

A aldosterona é sintetizada pela glândula supra-renal. Existe evidência que ela pode ser sintetizada também no coração e em vasos sanguíneos, apesar de que existe controvérsia em relação às quantidades produzidas, e ao real impacto fisiológico (69). Os efeitos mais conhecidos da aldosterona são sobre o balanço eletrolítico de sódio e potássio nos rins, e conseqüente controle

do volume plasmático. A aldosterona é capaz de agir também diretamente sobre o sistema vascular, como revisado por Schiffrin (69). A aldosterona age sobre o endotélio modulando as ações da angiotensina II (stress oxidativo, conseqüente disfunção endotelial e degradação do óxido nítrico), ativando a fosfolipase C (levando a vasoconstrição por uma via não genômica), agindo sobre canais iônicos (podendo levar a um inchamento das células endoteliais com posterior enrijecimento e disfunção endotelial), e aumento na atividade de NAD(P)H oxidase (aumentando as espécies reativas de oxigênio, o que leva ao stress oxidativo e inflamação). A aldosterona é capaz de agir sobre os tecidos cardíaco, vascular e renal, induzindo fibrose através de uma ação direta pró-inflamatória, especialmente em presença de altas taxas de sal. Sobre as células de musculatura lisa vascular, a aldosterona agiria mediando grande parte dos efeitos da angiotensina II (é capaz de fazer um aumento na transcrição dos receptores de angiotensina, e da ECA, aumentando conseqüentemente a concentração e ação local da angiotensina II), atua sobre a proliferação celular (em conjunto com a angiotensina II tanto por vias que envolvem transcrição genética como em vias diretas - Figura 4)

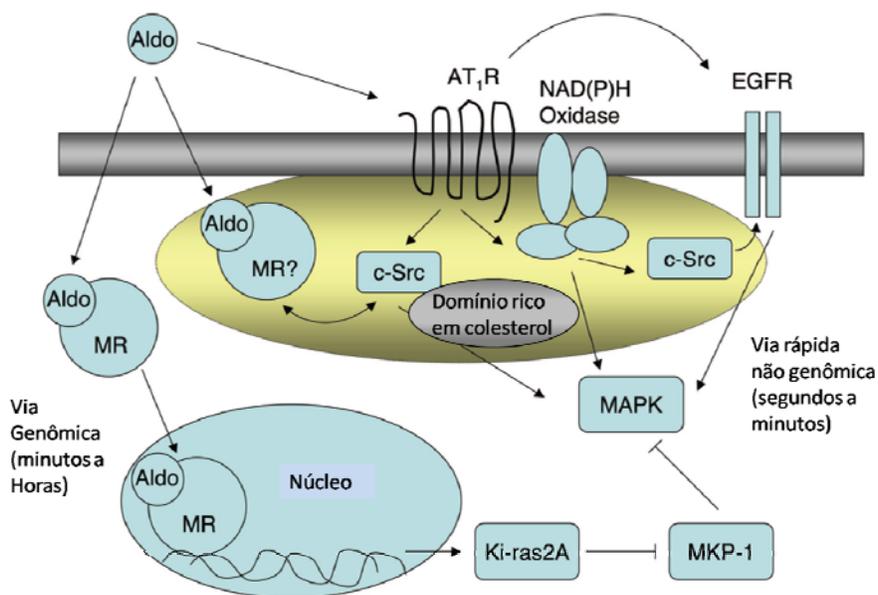


Figura 4- Vias de sinalização Intracelular da Aldosterona. Estas vias são divididas em genômica (lenta) e não genômica (rápida). Resumidamente, a aldosterona ativa a tirosina quinase c-Src, levando a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida por estimulação de NAD(P)H oxidase na via das MAP quinases. Estes eventos ocorrem em domínios da membrana ricos em colesterol, chamados *lipid rafts*. Ocorre também um *cross-talk* com as vias de sinalização da angiotensina através de ativação dos receptores AT1 (mecanismo não elucidado), o qual também sinaliza em parte pela via c-Src e NAD(P)H oxidase. MAP quinases são inibidas por MKP-1, a qual é inibida por Ki-ras2A. Este último é estimulado por ativação gênica através dos efeitos genômicos da aldosterona, o que, portanto, resulta na ativação da via das MAP quinases levando a fibrose, crescimento celular, e processos de remodelamento. ALDO=aldosterona; MR=receptor mineralocorticoide; AT1R=receptor de angiotensina 2 tipo 1; MAPK=proteína quinase ativada por mitógenos; MKP-1=*big* proteína quinase ativada por mitógenos, tipo 1; Ki-ras2A=membro da família de oncoproteínas ras; C-src=Proteína quinase também chamada CSK; EGFR=receptor de fator de crescimento epidérmico. Adaptado de (Schiffrin, 2006).

Pelo fato da aldosterona causar uma *upregulation* dos receptores da angiotensina II, é possível que ocorra um efeito “bola de neve”, uma vez que a angiotensina II através dos receptores AT1 estimula produção e liberação de aldosterona pela glândula supra-renal, o que por sua vez aumenta a atividade da ECA tecidual, o que aumenta sucessivamente a angiotensina II, levando a aumentos adicionais dos níveis de aldosterona (69). Desta forma, imagina-se que uma combinação de bloqueador de receptor mineralocorticóide acoplado a um inibidor da ECA possa ser a terapia anti-aterogênica mais eficiente no futuro.

1.4- Remodelamento cardiovascular

O remodelamento cardiovascular consiste em espessamento e enrijecimento das artérias, acompanhado de hipertrofia e perda de contratilidade cardíaca (70). Este efeito é causado por quebra de fibras de elastina, depósito de colágeno, fibrose, inflamação, necrose da musculatura lisa medial, calcificações, e difusão de macromoléculas para o interior da parede arterial (71). A deposição de colágeno em artérias coronárias contribui para a redução na reserva coronariana, potencializando a isquemia do miocárdio. No contexto de hipertrofia cardíaca, esta é uma resposta de adaptação fisiológica a uma sobrecarga crônica de pressão, uma vez que permite a ejeção normal, apesar da sobrecarga hemodinâmica (70). Apesar disto, a Hipertrofia cardíaca se constitui em um fator independente para morte súbita, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca. A maioria das complicações decorrentes da hipertensão arterial é mediada pelo remodelamento cardiovascular, dentre elas a formação e o rompimento de placas ateroscleróticas, ruptura de vasos, entre outros.

A aldosterona atua de forma direta no remodelamento cardiovascular, de tal forma que dois estudos clínicos importantes demonstraram benefícios do uso de antagonistas de receptores mineralocorticóides sobre o remodelamento cardiovascular: RALES (72) e EPHEBUS (73). Estes efeitos não podem ser explicados apenas pela ação da aldosterona sobre o volume plasmático dos pacientes (74).

1.4.1- Velocidade de onda de pulso

Após a sístole cardíaca, as artérias de grande porte absorvem parte da força da pressão sanguínea contra suas paredes, sofrem uma distensão mecânica, e em seguida, por sua propriedade elástica, retransmitem essa força ao longo do vaso (onda de pulso) (Figura 5), de forma a atenuar o pico de pressão gerado pela sístole sem perder a capacidade de perfusão sanguínea, e gerar um fluxo contínuo nos capilares sanguíneos, os quais não são preparados para resistir à grande variabilidade de pressão.

Existem duas propriedades que tem grande influência sobre a pressão sanguínea no ponto de vista arterial: resistência vascular periférica, e complacência arterial. Se houver um aumento somente na resistência vascular periférica, há um aumento tanto na pressão arterial sistólica (PAS) como na diastólica (PAD). Se houver concomitantemente uma diminuição na complacência arterial (rigidez causada por remodelamento vascular), há um aumento na oscilação entre as pressões, resultando em aumento desproporcional na PAS e pouca diferença na PAD (71); por isto, somente a PAD normalizada como critério de PA controlada é inadequado (74). Em situação fisiológica normal existe uma diminuição progressiva da função de amortecimento partindo da aorta descendente (artéria mais elástica) em direção às artérias periféricas (menos elásticas e com maior componente muscular). Quando a onda de pulso passa das artérias complacentes para os vasos periféricos (de alta resistência), ocorre uma reflexão da onda de pulso, criando ondas retrógradas. Isto influencia as flutuações secundárias no formato da onda de pressão na diástole e explica a observação de aumento da pressão de pulso central acompanhada de aumento na pressão arterial sistólica em situações de espessamento arterial (71). A heterogeneidade natural na espessura arterial tem importantes conseqüências fisiológicas: uma onda de pressão que se propagasse em um tubo visco-elástico sem sítios de reflexão seria progressivamente atenuada, com uma taxa de redução exponencial ao longo do tubo. O que ocorre, porém é que em um tubo visco-elástico com numerosas subdivisões, a onda de pulso é amplificada,

devido às ondas de reflexão. Particularmente, nas artérias periféricas, as ondas de reflexão são capazes de amplificar a onda de pulso, pois os pontos de reflexão são muito mais próximos a sítios periféricos do que às artérias centrais, e a VOP é maior nas artérias periféricas, que são mais espessas. O resultado é que a amplitude na onda de pulso é maior em artérias periféricas que nas artérias centrais, chamado “fenômeno de amplificação”. Quanto mais espesso um vaso, maior a velocidade de propagação das ondas de pulso em direção à periferia e em direção retrógrada (71).

A VOP mais estudada é a determinada entre as artérias carótida e a femoral direita, uma vez que este é o trecho que “filtra” a maior parte da variabilidade de pressão arterial e é justamente o trecho mais suscetível à maior parte dos efeitos patofisiológicos do espessamento arterial. Além disso, a VOP carótida-femoral é a que possui maior evidência de valor preditivo para desfechos cardiovasculares, além de exigir pouca prática técnica para sua determinação (71)

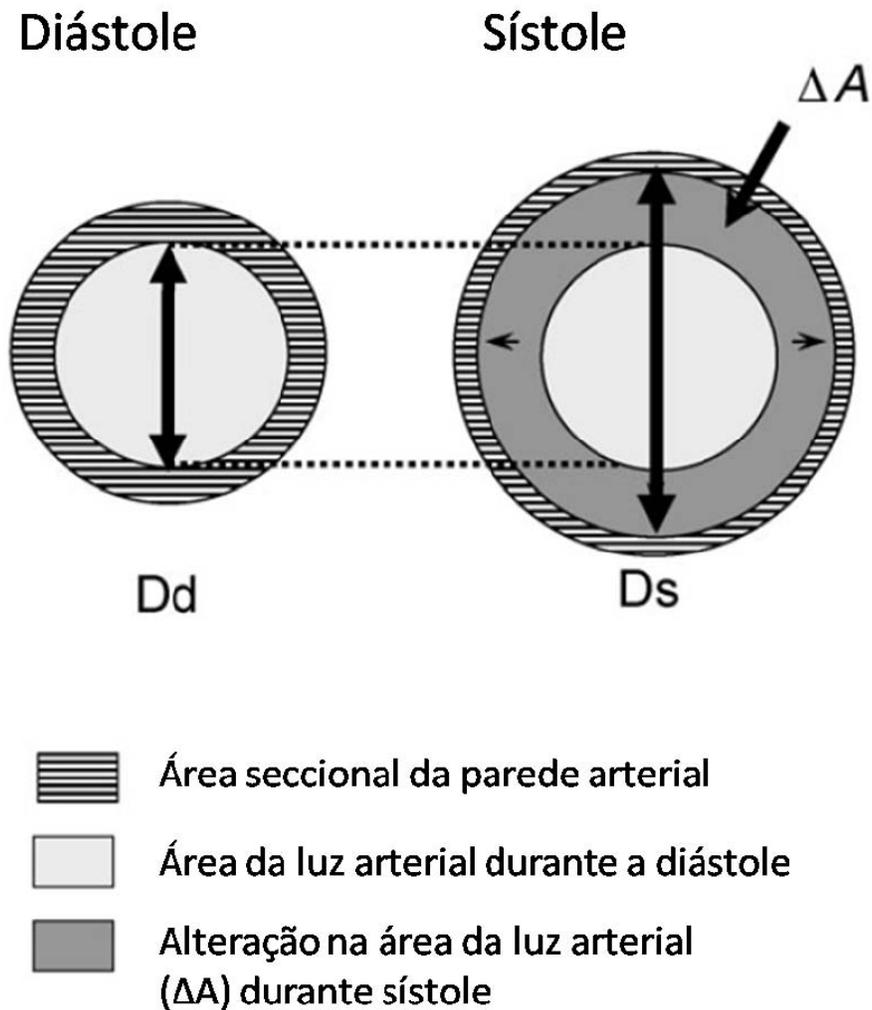


Figura 5- Complacência arterial durante a sístole. Adaptado de (Laurent, Cockcroft et al., 2006)

O princípio básico da determinação da velocidade de onda de pulso (VOP) é que o pulso de pressão gerado pela ejeção ventricular que é propagado ao longo das artérias tem sua velocidade determinada pelas propriedades elásticas e geométricas da parede arterial (75). A velocidade com que este pulso é transmitido ao longo das paredes arteriais é diretamente proporcional à rigidez das mesmas. A detecção do pulso se dá através do uso de sensores posicionados sobre a pele (mecânicos, ou por ultra-som) que detectam a onda de pulso sobre a artéria de interesse. A VOP é calculada através da determinação do tempo de

trânsito do pulso e a distância percorrida pelo mesmo, entre dois locais de medida de acordo com a fórmula: $VOP \text{ (m/s)} = \text{distância (m)} / \text{tempo de trânsito (s)}$. A VOP carótida-femural é calculada pelo tempo de atraso entre o início da base da onda proximal (carótida) e o início da base da onda distal (femoral), método chamado “*foot to foot*”, e pela medida da distância superficial que separa os respectivos transdutores (75). Na figura 6 podemos ver esquema do método “*foot to foot*”.

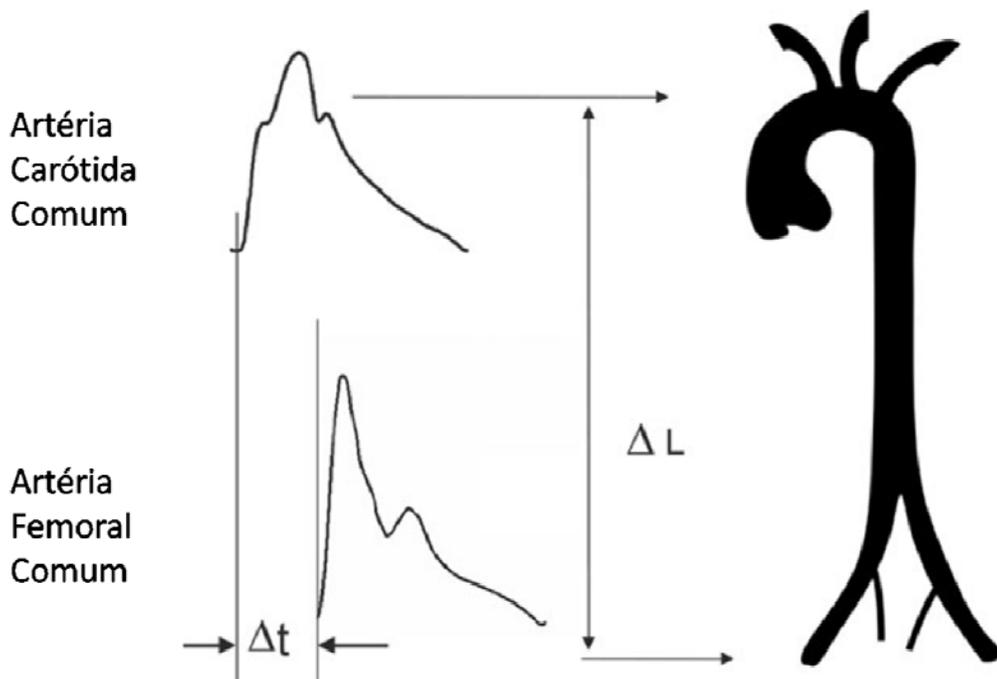


Figura 6- Medida da VOP pelo método “*foot to foot*”. Neste método se determina o tempo de atraso entre o início da onda de pulso da carótida e o início da onda de pulso na femoral, registradas simultaneamente. Este tempo é usado para dividir uma estimativa da distância percorrida pela onda de pulso. Adaptado de (Laurent, Cockcroft et al., 2006).

A VOP foi proposta como padrão-ouro da medida de espessamento arterial, uma vez que é uma medida mais direta de espessamento, tem boa reprodutibilidade, e existe evidência de um grande número de estudos prospectivos independentes que suportam seu uso como previsor independente de desfechos vasculares (71, 76).

Já está comprovado também, que o tratamento anti-hipertensivo a longo prazo é capaz de reduzir a VOP, independentemente da redução da PA (74, 75).

1.4.2- Espessura da íntima média da artéria carótida

O espessamento arterial e a reflexão de ondas de pulso são aceitos como os fatores determinantes para o aumento da pressão sistólica e pressão de pulso associados ao envelhecimento, portanto participam de forma importante como causas para ataques cardíacos e infarto do miocárdio (71). O mecanismo seria que um aumento na espessura arterial causaria um retorno prematuro das ondas de reflexão durante a sístole, aumentando a pressão de pulso central, e conseqüentemente a pressão sistólica. A PAS aumentada aumentaria a carga sobre o ventrículo esquerdo, aumentando a demanda por oxigênio. Além disso, o espessamento arterial está ligado com a hipertrofia ventricular esquerda, um fator de risco conhecido para eventos coronários, tanto em pacientes normotensos como hipertensos. Além disto, um aumento na espessura da carótida está relacionado a acúmulo (77) e ruptura de placas ateroscleróticas (71).

1.5- Fatores Genéticos

Além de fatores ambientais para a predisposição à hipertensão, como ingestão de sódio, stress, entre outros, existem fatores genéticos que podem ter influência sobre mecanismos de controle da pressão arterial.

Como a hipertensão refratária representa um fenótipo extremo, é possível que fatores genéticos possam ter uma participação mais significativa nesta situação do que no fenótipo mais geral de hipertensão (9).

Os fatores genéticos envolvidos neste trabalho fazem parte da classe dos polimorfismos de único nucleotídeo (*Single nucleotide polymorphisms* - SNPs). Este tipo de polimorfismo pode alterar sítios de reconhecimento de fatores de transcrição e alterar seqüências de códons, dentre outros efeitos, podendo modular a atividade e expressão da proteína.

1.5.1- O gene *CYP11b2*

O gene *CYP11b2* codifica uma proteína do grupo dos citocromos P-450, família 11, subfamília B, polipeptídeo 2. Este gene também é conhecido pelos nomes *CPN2*, *ALDOS*, *CYP11B*, *CYP11BL*, *P450C18*, *P-450C18*, *P450aldo*. Os citocromos P450 são monooxigenases que catalizam diversas reações envolvendo metabolismo de fármacos e síntese de colesterol, esteróides, e outros lipídeos. Esta proteína se localiza na membrana interna da mitocôndria. A enzima tem atividade 18-hidroxilase (em esteróides) para sintetizar aldosterona e 18-oxocortisol e atividades 11-beta-hidroxilase e 18 oxidase (em esteróides), necessárias para a síntese de aldosterona (78). Mutações neste gene podem causar deficiência de corticoesterona metil oxidase. O gene se localiza no cromossomo 8, região 8q21-q22, e possui 2930 pares de base, gerando uma proteína com 503 aminoácidos. O gene possui um sítio para anelamento do fator de transcrição *Steroidogenic Factor 1* (79), porém este não parece estar envolvido com o aumento na transcrição deste gene (80).

O gene *CYP11b2* parece estar associado a uma rara forma mendeliana de hipertensão, o aldosteronismo remediado por glicocorticóides (81), e haplótipos neste gene parecem estar associados com hipertensão essencial (81). Além disso, uma conversão comum no íntron 2 (uma troca pela seqüência do gene homólogo, *CYP11b1*) pode contribuir para aumento da PA em hipertensos (78, 82).

Entre os diferentes genes que codificam os componentes do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, o gene que codifica a enzima sintase da aldosterona (*CYP11B2*) participa de forma crucial, pois é a enzima responsável pelo passo final na síntese de aldosterona nas células justa glomerulares na glândula supra-renal (conversão de desoxicorticoesterona em aldosterona) (83). Um dos polimorfismos mais estudados é um SNP na região promotora do gene, posição -344 C/T (troca de citosina por timina), postulado como sítio de anelamento do fator de transcrição *steroidogenic factor 1* (79). Há alguma controvérsia em relação à associação entre alelos deste polimorfismo com hipertensão arterial, sendo mais comum a associação com o alelo T (82, 84). Existe associação na literatura da presença do alelo T com maior risco de desenvolvimento de hipertensão arterial refratária (85). Além disso, foram relatadas correlações entre o alelo T e maior espessura de parede cardíaca (indicador de remodelamento cardiovascular) em pacientes de cardiomiopatia hipertrófica (86), e com insuficiência sistólica cardíaca crônica (87). O mesmo alelo T foi relacionado a níveis mais altos de aldosterona circulante em indivíduos com alta ingestão de sódio (88), e reduzido efeito hipotensor dos tratamentos anti-hipertensivos (89). Na tabela 1 estão relacionadas as distribuições genotípicas deste polimorfismo em diversas populações diferentes.

Tabela 1- Frequência genotípica do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* em populações diferentes

População	CC (%)	CT (%)	TT (%)	Referência
Caucasianos Americanos	20	48	32	Biolo et al, 2007 (87)
Caucasianos Britânicos	25	55	20	Zhu et al, 2002 (78)
Caucasianos Franceses	21	50	29	Tiret et al, 2000 (90)
Caucasianos Escoceses	20	53	27	Davies et al, 1999 (82)
Caucasianos Italianos	28	46	26	Rossi et al, 2001 (91)
Caucasianos Alemães	34	44	22	Brand et al, 1999 (92)
Japoneses	10	42	48	Tsujita et al, 2001(93)
Afro Americanos	8	39	53	Biolo et al, 2007 (87)
Afro Britânicos (descendência africana ou afro-caribenha)	1	37	61	Zhu et al, 2002 (78)
Brasileiros	27	54	19	Freitas et al, 2007 (85)

É possível que o polimorfismo -344C/T na aldosterona sintase tenha influência sobre o remodelamento cardiovascular, bem como na refratariedade aos tratamentos farmacológicos usados na hipertensão.

Freel (83, 94) e colaboradores publicaram uma nova teoria em que o polimorfismo -344C/T estaria em desequilíbrio de ligação com algum fator no gene *CYP11b1*, que regula a produção de cortisol, atribuindo a este os efeitos deletérios encontrados nos pacientes hipertensos. Assim sendo, serão estudados também os níveis de cortisol circulantes dos pacientes.

1.5.2- O gene *MDR-1*

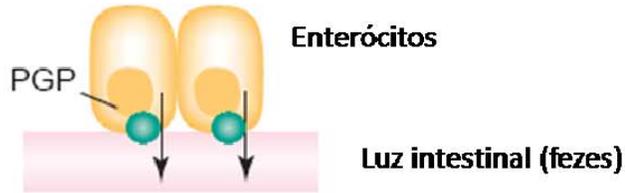
O gene *MDR-1* codifica uma proteína da superfamília de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC). Proteínas do tipo ABC transportam várias moléculas através de membranas extracelulares e intracelulares. Os genes

ABC são divididos em sete subfamílias distintas (*ABC1*, *MDR/TAP*, *MRP*, *ALD*, *OABP*, *GCN20*, *White*). Alterações neste grupo de genes têm associações com algumas doenças genéticas como fibrose cística, doença de Stargardt, degeneração macular relacionada à idade, adrenoleucodistrofia, doença de Tangier, síndrome de Dubin-Johnson (95). O gene *MDR-1* faz parte do grupo *MDR/TAP*, o qual está envolvido a multi-resistência farmacológica. A proteína codificada por este gene se chama p-glicoproteína (PGP), e age como uma bomba de efluxo (ATP dependente) de compostos xenobióticos com ampla especificidade a diferentes substratos. Ela é responsável por reduzido acúmulo de fármacos em células multi-resistentes, e freqüentemente é o mediador do desenvolvimento de resistência farmacológica à anti-tumorais por células tumorais. Esta proteína também funciona como transportador na barreira hematoencefálica.

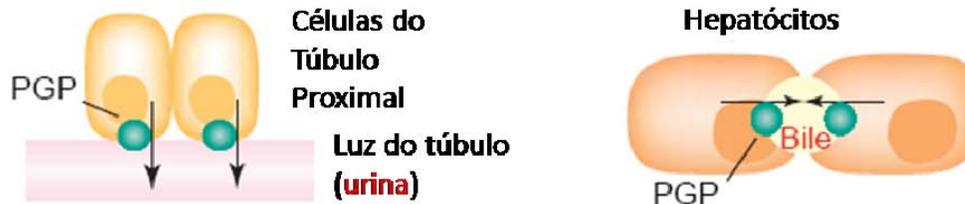
O gene *MDR-1* também é conhecido por *CLCS*, *P-gp*, *PGY1*, *ABC20*, *CD243*, *GP170*, *MGC163296*, *ABCB1*. Ele se localiza no cromossomo 7, na região 7q21.1, e tem 4872 pares de base divididos em 28 exons, e a proteína possui 1280 aminoácidos. A proteína consiste de duas metades homólogas, Ada uma com seis domínios transmembrana e um sítio de ligação de ATP (96).

A aldosterona é substrato para a p-glicoproteína (PGP) (97, 98), e recentemente foi demonstrado que esta proteína modula a secreção (99) e distribuição da aldosterona no corpo (100). Ela é responsável por um sistema de efluxo ativo de substâncias lipofílicas para fora das células (96). Na figura 7 estão resumidas as principais participações da PGP sobre o transporte de substâncias lipofílicas.

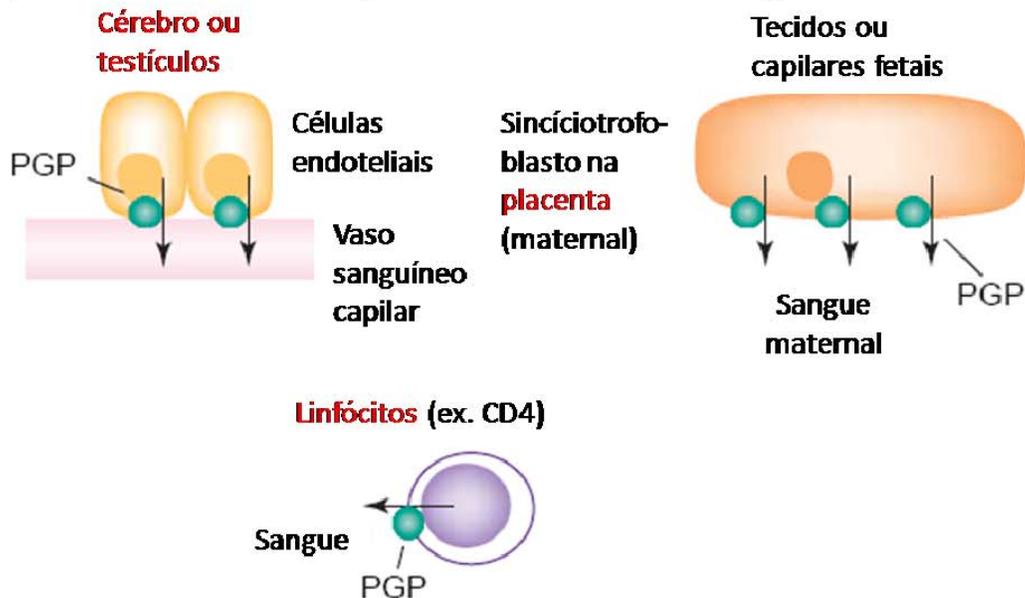
(a) Limita a absorção de seus ligantes



(b) Eliminação ativa de seus ligantes



(c) Limita distribuição tecidual dos seus ligantes



TRENDS in Pharmacological Sciences

Figura 7- Principais atuações da PGP (produto do gene *MDR-1*). **a)** a PGP reduz a absorção intestinal de seus substratos. **b)** a PGP aumenta a excreção renal e hepática de seus substratos. **c)** a PGP reduz a distribuição tecidual de seus substratos. Adaptado de (Fromm, 2004).

Existe um polimorfismo no gene *MDR-1* no exon 26, posição 3435C/T (troca de citosina por timina) associado com variações na expressão deste transportador (101). O alelo T é relacionado à menor expressão e estabilidade do mRNA (102), e o alelo C é associado a uma maior atividade da p-glicoproteína (103). A importância disto é que como a aldosterona precisa atravessar as membranas celulares para chegar a seu receptor nuclear, e a p-glicoproteína transporta a aldosterona na membrana celular para fora das células, se houver grande atividade ou expressão da p-glicoproteína, as células terão certa resistência à aldosterona por mecanismo de efluxo. Este mecanismo é observado em alguns tumores resistentes a antitumorais (95). Isto poderia levar a fenótipos com maior ou menor sensibilidade celular à aldosterona dependendo da expressão da PGP (100). Além disto, o alelo C poderia estar relacionado a uma maior secreção renal de aldosterona após estímulo pela angiotensina II (99). Na tabela 2 estão relacionadas as distribuições genotípicas do polimorfismo 3435C/T em diversas populações diferentes.

Tabela 2- Frequências alélicas do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1* em populações diferentes

População	Alelo C (%)	Alelo T (%)	Referência
Caucasianos Alemães	50	50	Schaeffeler et al, 2001 (104)
Caucasianos Italianos	54	46	Furuno et al, 2002 (105)
Caucasianos Britânicos	48	52	Ameyaw et al, 2001 (106)
Sauditas	55	45	Ameyaw et al, 2001 (106)
Portugueses	43	57	Ameyaw et al, 2001 (106)
Chineses	53	47	Ameyaw et al, 2001 (106)
Japoneses	54	46	Horinouchi et al, 2002 (107)
Africanos	90	10	Schaeffeler et al, 2001 (104)
Afro-Americanos	78	22	Schaeffeler et al, 2001 (104)

Adaptado de Marzolini et al, 2004 (108)

O *MDR-1* também está envolvido em resistência a alguns tratamentos farmacológicos devido à sua alta expressão nas células epiteliais intestinais. Desta forma, seus polimorfismos têm influência sobre a absorção intestinal, excreção renal e biliar de alguns fármacos (108, 109). Alguns exemplos de anti-hipertensivos cuja biodisponibilidade é alterada são Digoxina, Verapamil, Diltiazem e Losartan, entre outros (110). Na tabela 3, estão relacionados fármacos que são de fato transportados pela PGP.

Outros transportadores de fármacos poli-específicos também estão sendo estudados sob o mesmo foco: transportadores relacionados à multi-resistência MRP (família *ABCC*), proteínas de transporte de ânions orgânicos (família OATP (*SLC01* e *SLC02* - basicamente o *SLC21A*)), e uma família de transportadores (*SLC22A*) de cátions (OTCs), ânions (OATs) e carnitina e cátions (OTCN5) (110)

Tabela 3- Fármacos que são substratos, indutores ou inibidores da p-glicoproteína

Categoria	Fármaco	Substrato	Inibidor	Indutor
Fármacos Antitumorais	Actinomicina D	X		
	Daunorubicina	X		
	Docetaxel	X		
	Doxorubicina	X		
	Etoposídeo	X		
	Imatinib	X		
	Irinotecan	X		
	Mitomicina C	X		
	Mitoxantrona	X		
	Paclitaxel	X		
	Teniposídeo	X		
	Topotecan	X		
	Vimblastina	X		
Vincristina	X			
Anti-Hipertensivos	Carvedilol		X	
	Celiprolol	X		
	Diltiazem	X		
	Losartan	X		
	Nicardipina			X
	Reserpina			X
	Taliolol	X		
Anti-Arrítmicos	Amiodarona		X	
	Digoxina	X		
	Propafenona			X
	Quinidina	X		X
	Verapamil	X		X
Glicocorticóides	Aldosterona	X		
	Cortisol	X		
	Dexametasona	X		X
	Metilprednisolona	X		

Categoria	Fármaco	Substrato	Inibidor	Indutor
Outros	Atorvastatina	X	X	
	Bromocriptina		X	
	Colchicina	X		
	Dipiridamol		X	
	Emetina		X	
	Fexofenadina	X		
	Ivermectina	X		
	Loperamida	X		
	Mefloquino	X	X	
	Progesterona		X	
	Ácido Retinóico			X
	Rodamina 123	X		
	Espironolactona		X	
	Terfenadina	X		
	Vecuronium	X		
Agentes antiretrovirais	Amprenavir	X		X
	Indinavir	X	X	X
	Nelfinavir	X	X	X
	Ritonavir	X	X	X
	Saquinavir	X	X	X
Antibióticos	Claritromicina		X	
	Eritromicina	X	X	
	Levofloxacino	X		
	Rifampina	X		X
	Sparfloxacino	X		
	Tetraciclina	X		
Antimicóticos	Itraconazol	X	X	
	Cetoconazol		X	
Imunossupressivos	Ciclosporina	X	X	
	Sirolimus	X	X	
	Tacrolimus	X	X	
	Valspodar	X	X	

Categoria	Fármaco	Substrato	Inibidor	Indutor
Antidepressivos	Amitriptilina	X		
	Fluoxetina		X	
	Paroxetina		X	
	Sertralina		X	
Neurolépticos	Cloropromazina		X	
	Flupentixol		X	
	Fenotiazina			X
Antiepilépticos	Fenobarbital	X		
	Fenitoína	X		
Antiácidos	Cimetidina	X		
	Ranitidina	X		
Opióides	Metadona		X	
	Morfina	X		X
	Pentazocina		X	
Antieméticos	Domperidona	X		
	Ondasetrona	X		

Adaptado de Marzolini et al, 2004 (108)

2- OBJETIVOS

É o objetivo principal deste estudo

- Investigar associação entre alelo T no polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* e o fenótipo de resistência ao tratamento anti-hipertensivo

São objetivos secundários deste estudo

- Investigar possíveis alterações em parâmetros clínicos (níveis de pressão arterial, concentração plasmática de aldosterona, cortisol e renina; VOP carótida-femoral, EIM de carótida, número de anti-hipertensivos) associadas ao alelo T no polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* em hipertensos
- Avaliação preliminar da associação entre alelo C no polimorfismo 3435 C/T do gene *MDR-1* e o fenótipo de resistência ao tratamento anti-hipertensivo
- Avaliação preliminar de possíveis alterações em parâmetros clínicos (níveis de pressão arterial, concentração plasmática de aldosterona, cortisol e renina; VOP carótida-femoral, EIM de carótida, número de anti-hipertensivos) associadas ao alelo C no polimorfismo 3435 C/T do gene *MDR-1* em hipertensos

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Características dos Pacientes

Foram avaliados 340 indivíduos, dos quais 88 eram portadores de HAR que preencheram os requisitos de inclusão no estudo, 142 indivíduos eram hipertensos moderados e responsivos a tratamento farmacológico (HT). Os demais indivíduos (n= 110) constituíram o grupo controle. Este último grupo foi usado apenas nas análises genéticas, sendo em demais análises comparados apenas os grupos HAR e HT. O tamanho da amostra (mínimo de 70 para cada grupo) foi estimado com base em um poder de teste de 80% de se demonstrar os objetivos do estudo através de regressão logística sob risco alfa de 5% bilateral. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP em 22 de janeiro de 2002 (PARECER PROJETO N° 315/2001) (Anexo 1).

3.2- Desenho do estudo

Este é um estudo de corte; isto é, não houve um acompanhamento ao longo do tempo da influência dos polimorfismos sobre o desfecho clínico dos pacientes. Inicialmente os indivíduos foram divididos em três grupos: Controle, HT e HAR, para o estudo de associação com o polimorfismo na aldosterona sintase. Em um número menor de hipertensos (36 HT e 42 HAR), os indivíduos foram separados de acordo com os alelos que carregavam e foram comparados seus dados bioquímicos e de remodelamento vascular. Neste mesmo número menor de indivíduos foi feita a genotipagem do gene *MDR-1*, e seus alelos também foram comparados aos dados bioquímicos e de remodelamento vascular.

3.3- Seleção e acompanhamento clínico dos pacientes

Os pacientes com HAR de ambos os sexos foram encaminhados dos vários setores clínicos do Hospital das Clínicas da UNICAMP, atendidos, tratados, e acompanhados clinicamente no Ambulatório de Hipertensão Refratária da FCM-UNICAMP. Os critérios para seleção inicial dos grupos são descritos a seguir.

Grupo Hipertensão arterial refratária (HAR): critérios estabelecidos pelo JNC VII - USA (8) e diretrizes brasileiras (111). PA>140/90 na vigência do uso de 3 ou mais fármacos anti-hipertensivos, sendo um deles obrigatoriamente um diurético em dose plena e os outros em doses terapêuticas preconizadas

Grupo Hipertensão Arterial Moderada Responsiva (HT): critérios estabelecidos pelo JNC VII - USA (8) e diretrizes brasileiras (111). PA < 135/85 mmHg em indivíduos hipertensos com boa resposta terapêutica a terapia não farmacológica e farmacológica convencional.

Grupo Controle (CT): formado por voluntários que não apresentaram sinais e ou sintomas de doença arterial hipertensiva, nem antecedente familiar de hipertensão arterial e suas complicações.

A idade do grupo Controle variou de 33 a 72 anos (média = $45,3 \pm 7,7$), no grupo HT variou de 18 a 73 (média = $50,6 \pm 14,1$), e HAR variou de 24 a 71 anos (média = $50,6 \pm 9,9$ anos). No grupo Controle, 42,2% dos indivíduos eram do sexo masculino e 57,8% dos indivíduos eram do sexo feminino. No Grupo HT eram 32% homens e 68% mulheres, e no grupo HAR 32% homens e 68% mulheres. A distribuição entre negros e brancos foi 47% negros e 53% brancos no grupo controle, 28,7% negros e 71,3% brancos no grupo HT, e 44,6% negros e 55,4% brancos no grupo HAR (critério de definição de raça por auto-definição do indivíduo).

Todos os pacientes foram acompanhados clinicamente por especialistas e receberam tratamento para suas afecções de acordo com os padrões e normas clínicas vigentes. Somente foram incluídos os pacientes que aceitaram as condições do consentimento informado (Anexo 2). De um total de 280 indivíduos com suspeita de HAR, 33% foram excluídos em uma primeira triagem, sendo 67% cadastrados. Foi feita então uma segunda triagem, onde apenas 47% se encaixaram nos critérios de HAR (n=88). Na tabela 4 está apresentada a seleção dos fármacos prescritos em nosso ambulatório.

Tabela 4- Seleção de fármacos prescritos no ambulatório de farmacologia cardiovascular HC/UNICAMP

Classe	Fármaco
Diuréticos	Hidroclorotiazida Indapamida Clortalidona Furosemida Clopamida Espironolactona
β-Bloqueadores	Propranolol Atenolol Metoprolol Pindolol Carvedilol
Inibidores da ECA	Captopril Enalapril Rapiiril Lisinopril
Bloqueadores de receptores AT2	Losartan Valsartan Candesartan Irbesartan Telmisartan Olmesartana
Bloqueadores de canais de Ca⁺²	Nifedipino Amlodipino Manidipino Verapamil Diltiazem
Fármacos de ação central	Metildopa
Vasodilatadores	Prazosina Minoxidil Hidralazina Isossorbida

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina I;

AT2: Receptor de Angiotensina II, do subtipo 2

3.3.1- Critérios de Inclusão

Os critérios para inclusão no estudo foram: ter diagnóstico de hipertensão refratária - pressão > 140/90 mmHg de acordo com protocolo padronizado de diagnóstico de HAR e exclusão das causas de pseudo-refratariedade, não adesão ao tratamento farmacológico e não farmacológico, HA secundária, co-morbidades e doenças associadas; ter HÁ controlada; possuir idade entre 21 a 75 anos; não apresentar doenças associadas; estar com consultas médicas programadas de forma habitual; ser capaz de compreender, verbalizar e responder questões; concordar em participar do estudo; assinar Termo de Consentimento Livre Esclarecido; estar em seguimento na unidade há pelo menos seis meses.

3.3.2- Critérios de Exclusão

Foram considerados critérios de exclusão: presença de cardiopatia isquêmica; valvulopatias; insuficiência cardíaca descompensada; arritmias cardíacas importantes; nefropatias; hepatopatias; uso de substâncias ilícitas.

3.4- Coleta de dados clínicos

Todos os dados clínicos foram coletados exclusivamente pela equipe médica do Ambulatório de Farmacologia Cardiovascular HC-FCM. As informações foram obtidas através de anamnese clássica, seguida pela realização de exame físico completo. O peso foi determinado com roupas leves, sem sapatos, utilizando balança mecânica Filizola 31 e a altura foi mensurada com régua antropométrica de 192 cm. O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado com base na fórmula: peso (kg) dividido pelo quadrado da altura (m).

3.5- Medida da pressão arterial

A base necessária para a avaliação da HA é a acurácia da mensuração da PA. Foi utilizado um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio, devidamente calibrado e aferido, com manguito de tamanho apropriado para a circunferência braquial em estudo. O ambiente calmo e as mensurações foram precedidas de um período de relaxamento de 5 a 15 minutos e no mínimo de 60 minutos após ingestão de café ou 30 minutos após consumo de cigarro, uma vez que os principais componentes químicos de ambos (cafeína e nicotina) elevam a pressão arterial. O paciente permaneceu sentado confortavelmente com o braço apoiado em um suporte, mantendo o mesmo à altura do coração, sendo necessárias, no mínimo duas medidas em cada braço com intervalos regulares para maior acurácia do método (4, 111). Para o cálculo das médias de PAS e PAD de cada grupo estudado, foram utilizadas as médias de PAS e PAD individuais do braço direito de cada sujeito, obtidas ao longo do estudo em ambulatório seguindo as práticas comentadas anteriormente.

Com relação à medida da PA residencial, foi recomendado aos pacientes que fosse realizada no posto de saúde mais próximo de sua moradia, pelo menos duas vezes por semana e anotada no cartão de registro da PA, fornecido pelo nosso serviço.

A monitorização ambulatorial da PA (MAPA) também foi realizada obedecendo as recomendações das III Diretrizes para uso da MAPA (112). Todos os indivíduos foram submetidos a MAPA por um período de 24h, pelo processo oscilométrico com devido equipamento (modelo nº 90207, Spacelabs, EUA). Assim foram obtidas a PA de 24 horas, de vigília, de sono, a PA média, e a pressão de pulso, usadas para fins de diagnóstico. As medidas da PA residencial e MAPA-24h foram utilizadas como critério diagnóstico para classificação dos pacientes como HT ou HAR, não sendo utilizadas para comparações estatísticas subseqüentes.

3.6- Estudo da Adesão ao Tratamento

A abordagem dos entrevistados para o estudo da adesão foi realizada em quatro entrevistas do seguinte modo: na primeira entrevista foi averiguada a aquisição de todos os medicamentos prescritos e se restava algum medicamento em casa de aquisições anteriores. Os medicamentos de custo elevado foram entregues em cada retorno do paciente ao ambulatório. Foi solicitada a entrega das embalagens vazias dos medicamentos anti-hipertensivos no retorno subsequente. Depois de terminada a primeira entrevista, os pacientes foram informados da necessidade, não obrigatória de serem realizados outros três retornos, para complementar o estudo sobre a adesão ao tratamento. Na segunda entrevista, de posse das embalagens vazias, foi calculado o número de comprimidos consumidos no intervalo entre a primeira e a segunda entrevista e os comprimidos que deveriam ter sido consumidos de acordo com a prescrição médica. Na terceira e quarta entrevista foram realizados os mesmos procedimentos da segunda entrevista. Em todos os retornos, os pacientes foram orientados em relação ao tratamento farmacológico e não farmacológico.

3.6.1- Método de contagem de comprimidos

Para determinar a adesão ao tratamento pela contagem de comprimidos foi utilizada a combinação das seguintes medidas:

A- A utilizada por Taylor e colaboradores (113); e Rand (114) que define adesão como a razão entre o número de “doses” prescritas tomadas pelo paciente e o número de “doses” prescritas para o paciente, podendo ser expressa em percentual, como demonstrado abaixo:

$$A_1 = \frac{\text{Nº de comprimidos x nº de vezes administradas x 100}}{\text{Nº de comprimidos x nº de vezes prescrita}}$$

B- Contagem de comprimidos (115), na qual a adesão é definida com base na discrepância entre o número de comprimidos restantes do tratamento prescrito e aqueles que deveriam ter sido utilizados, e pode ser expressa pela fórmula adaptada dos referidos autores como:

$$A_2 = \frac{\text{Nº de comprimidos consumidos até o dia da entrevista} \times 100}{\text{Nº de comprimidos prescritos que deveriam ter sido consumidos até o dia da entrevista}}$$

O parâmetro para definir adesão, usando a combinação dos dois métodos descritos acima, foi o consumo de pelo menos 80% dos comprimidos prescritos. Os pacientes que consumiram menos de 80% dos comprimidos foram classificados como não aderentes e aqueles que consumiram 80% ou mais dos comprimidos prescritos foram classificados como aderentes.

3.7- Avaliação laboratorial

Os pacientes elegíveis para o estudo foram agendados para coleta do material, triagem e para o estudo genético propriamente dito, através de duas coletas de sangue venoso periférico de aproximadamente 40mL em dois tubos Falcon contendo EDTA (concentração final de 1-2mg/mL), que foram mantidos à temperatura de -20°C até seu uso.

A coleta sanguínea foi realizada por punção da veia antecubital, entre 07h30min e 09h00min, após 10 minutos de repouso em posição sentada. Todos os participantes se encontravam em jejum de 12h, os fumantes foram orientados a não fumar por um período de 12 h e não ingerirem bebidas alcoólicas até 24h antes.

Os exames laboratoriais solicitados foram: glicemia de jejum, insulina basal, hemograma completo, hemoglobina glicosilada A1c, sódio e potássio séricos, sódio e potássio urinários, alanina transferase, aspartato transferase,

gama glutaril-trasnferase, fosfatase alcalina, ácido úrico, cortisol plasmático, colesterol total, fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDLc), fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDLc), triglicérides, uréia, creatinina, *clearance* de creatinina, concentrações séricas de renina e aldosterona, ácido vanil mandélico, proteinúria de 24h, hormônio estimulante da tireóide, tiroxina livre e urina tipo 1.

3.8- Avaliação da espessura da íntima - média das carótidas

Foi realizada a avaliação da espessura da íntima - média das paredes anterior e posterior da carótida, usando ultra-som de alta resolução (Powervision 6000, Toshiba, Japão). Este método encontra-se estabelecido e padronizado de acordo com o relatório do “*34^o Bethesda Conference Task Force #3 Noninvasive Atherosclerosis Measurement*”(116).

A luminosidade da sala foi controlada, com temperatura ajustada em 24°C. Para a realização do exame o paciente foi posicionado em decúbito dorsal, com a cabeça flexionada levemente voltada para o lado oposto ao examinado. Em geral retiram-se almofadas ou travesseiros. A imagem foi posicionada na tela, de forma que a porção cefálica seja demonstrada à esquerda. Tomando-se o cuidado de não comprimir exageradamente os tecidos com o transdutor: as estruturas venosas anteriores à carótida não foram colabadas. A interface lúmen - íntima e a interface média - adventícia foram nitidamente definidas tomando cuidado com a utilização correta do controle de ganho, correção de ângulo e inclinação da caixa de amostragem e da sua amplificação.

Utilizou-se aparelho de ultra som e transdutor vascular linear de alta resolução, freqüência de 7-10MHz, acoplado a microcomputador para mensuração automática da EIM. O protocolo de aquisição de imagens no segmento distal da carótida comum foi padronizado para mensuração no mínimo de 10 pontos ou de uma extensão mínima de 1,0 cm da artéria em sentido longitudinal excluindo o bulbo carotídeo (117, 118).

A EIM da carótida comum foi mensurada no segmento distal a partir de quatro ciclos cardíacos incidentes com a onda R do ECG usando um software (M'ATh, MEtris, França), que permite mensuração automatizada da EIM, a partir das imagens previamente obtidas. A análise é baseada na densidade da escala de cinza e um algoritmo específico de reconhecimento tissular, que permite uma mensuração automática sem dependência do leitor. A variabilidade entre as medidas da EIM deveria ser menor que 2%, o que realmente aconteceu (Figura 8).

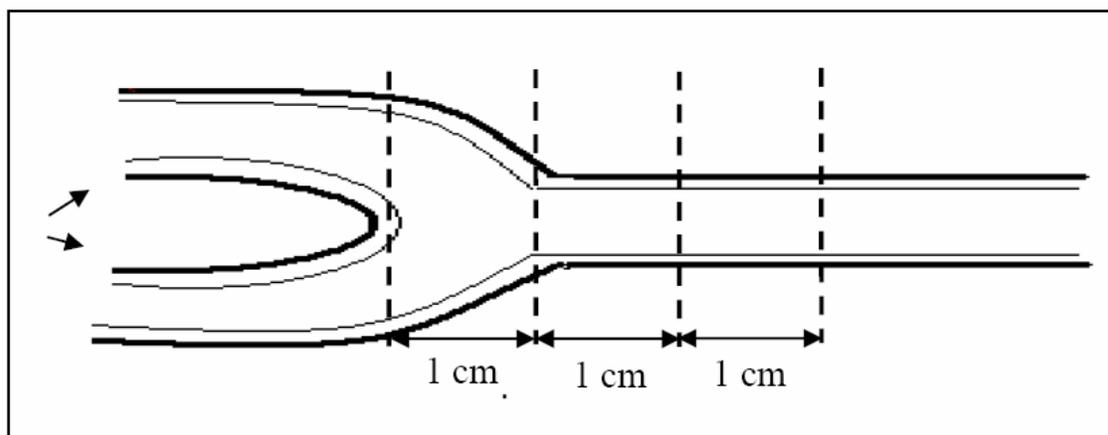


Figura 8- Esquema representativo do método de avaliação da EIM (espessura íntima - média da carótida comum com ultra-som de alta resolução e transdutor de 7-12 MHz). Adaptado de LONN (2001).

3.9- Avaliação da Velocidade de Onda de Pulso (Carótida-Femoral)

Os pacientes foram orientados a manter abstinência de cafeína e nicotina por pelo menos 12 horas antes do exame. O ambiente onde é feito o exame é silencioso, com temperatura controlada, em torno de 24°C. O exame foi feito após a consulta com a equipe médica dentre 11h e 12h. Os pacientes foram posicionados deitados em decúbito dorsal, onde permaneceram em repouso por dez minutos. Para avaliação da VOP, foi utilizado um sistema automatizado (Complior SP, Artech Medical, França). Os sinais da carótida e da femoral foram adquiridos simultaneamente com dois transdutores mecânicos sensíveis à pressão

e o tempo de trânsito do pulso foi calculado pelo software do equipamento. O software permite também a visualização em tempo real do formato das ondas de pulso para que o operador possa validá-las. A distância entre os dois sítios arteriais foi medida sobre o corpo utilizando uma fita métrica, e a VOP foi calculada como a distância dividida pelo tempo (metros por segundo).

3.10- Avaliação dos polimorfismos nos genes *CYP11b1* e *MDR-1*

3.10.1- Extração de DNA

O anticoagulante utilizado nas coletas de sangue foi o EDTA, uma vez que não interfere nas genotipagens. O DNA foi extraído de leucócitos pelo método de *Salting out*. O método consistiu de um primeiro passo de lise das hemácias com adição aos tubos de 35mL de solução “A” (Triton-X 1%, MgCl₂ 5mM, Sacarose 0,32mM, Tris-HCl 10mM), homogeneização e repouso dos tubos em recipiente com gelo, por 30 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 2000 RPM por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante é descartado. O precipitado é ressuspenso com 30mL da solução “A”, com posterior centrifugação a 2000 RPM por 10 minutos a 5°C, e o sobrenadante então é novamente descartado. Estes passos foram repetidos até o precipitado passar da cor vermelha para branca. O precipitado é ressuspenso então em 1mL de solução “B” (Na₂EDTA 10mM, NaCl 10mM, Tris-HCl 10mM), com posterior adição de 250µL de solução “C” (SDS 5%, Na₂EDTA 5mM, NaCl 5mM, Tris-HCl 5mM e Proteinase K 0,1%). Os tubos são incubados em banho-maria à 37°C por 24h. Após a incubação, é adicionado 1mL de solução Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8). Após adicionam-se 2mL de Fenol (equilibrado com tampão Tris-HCl, pH=8,0) e agita-se o tubo por inversão cuidadosamente. Os tubos são centrifugados a 2500RPM por 15 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa é cuidadosamente transferida para novo tubo de 15mL devidamente rotulado, e são adicionados 2mL de solução Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico (25:24:1). Os tubos são homogeneizados por inversão, e repete-se o passo de centrifugação. A fase aquosa é transferida para novo tubo Falcon, e adicionam-se 2mL de solução Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1). Agita-se por inversão e

centrifuga-se a 2500RPM por 10 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa é transferida para novo tubo, e a ele adicionam-se 200µL de Acetato de Sódio (3M, pH 5,5) e 4mL de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado é retirado do tubo com auxílio de bastão descartável, e lavado com etanol 70% para remover o excesso de sal. O DNA então é solubilizado em solução Tris-EDTA.

Após a extração o DNA é quantificado em espectrofotômetro (DU-65, Beckman, EUA) por absorção em 260nm. As amostras foram diluídas com solução Tris-EDTA para concentração final de 200pg/µL.

As amostras são submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% para analisar a integridade do DNA (figura 9).

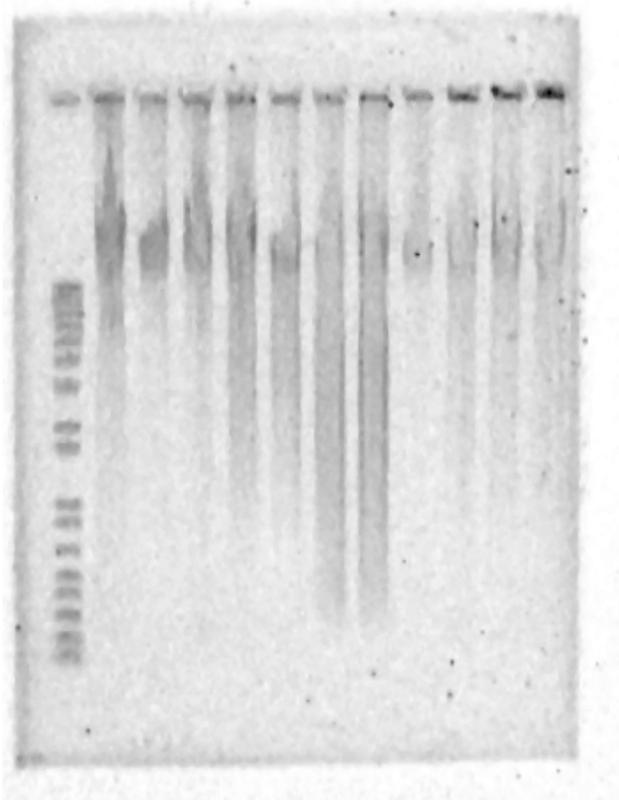


Figura 9- Teste de integridade do DNA. Primeira coluna: marcador de peso molecular 1kb plus. Demais colunas: amostras de DNA.

3.10.2- Genotipagem do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2*

O polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* foi genotipado através da técnica de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Esta técnica consiste de amplificação de uma região do DNA que contém o polimorfismo de interesse através da técnica de *polymerase chain reaction* (PCR) convencional com posterior digestão enzimática. A reação de PCR funciona da seguinte maneira: são desenhados e sintetizados dois oligômeros de aproximadamente 20 pares de base (pb) que são os complementares inversos a seqüências gênicas próximas à região de interesse no DNA, sendo um anterior e outro posterior à essa região. Durante a reação é feita uma desnaturação da dupla fita de DNA através de aquecimento, separando as duas fitas complementares inversas. Os *primers* então, por serem de tamanho reduzido, conseguem anelar ao DNA antes da fita complementar, uma vez que precisam de menor energia para a ligação do que a fita complementar do DNA. Após os *primers* ligarem ao DNA, uma enzima DNA polimerase presente na reação reconhece os *primers* pareados e passa a adicionar nucleotídeos (solubilizados na reação) na extremidade 5'fosfato do *primer*. Em seguida, é feita nova desnaturação, e o próprio produto passa a participar da reação sendo também reconhecido pelos *primers*. O número de moléculas com a seqüência de interesse passa a ser multiplicada de maneira exponencial, de forma que no fim da reação podemos ter mais de um bilhão de cópias da mesma (Figura 10).

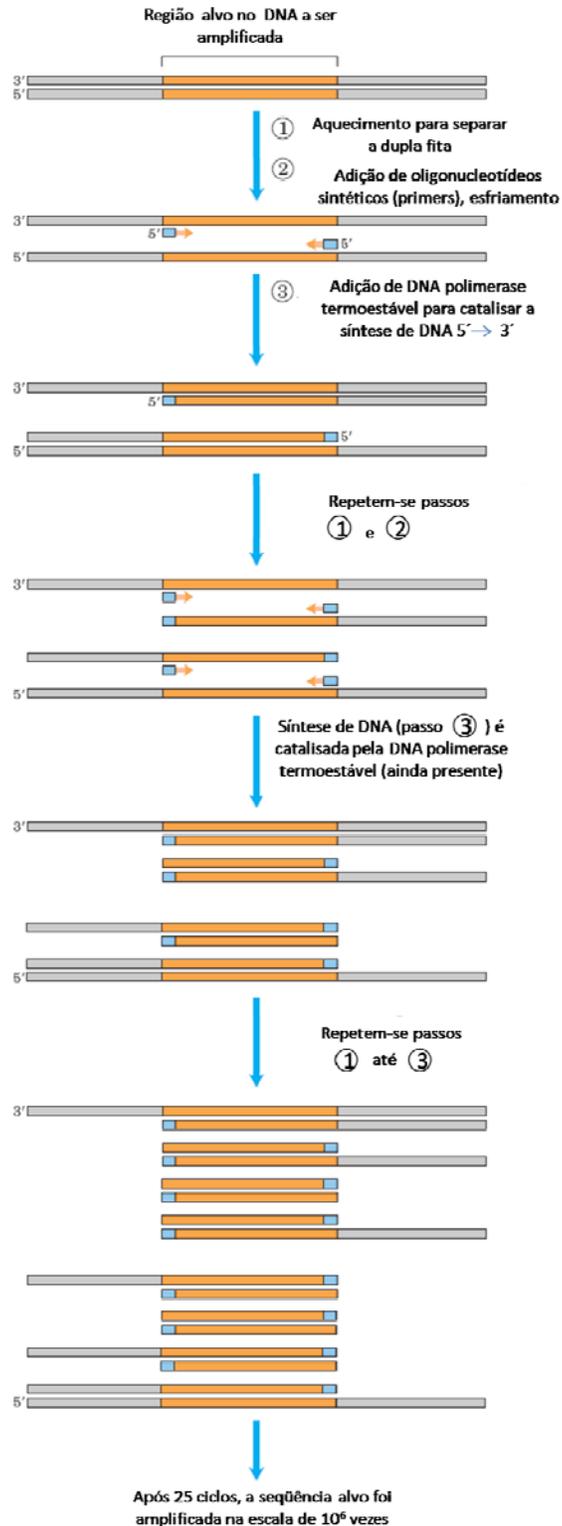


Figura 10- Representação esquemática de uma reação de PCR. Adaptada de LEHNINGER - *Principles of Biochemistry* (Lehninger, Nelson et al., 2005).

Em seguida é feita uma digestão do produto de PCR com uma endonuclease específica que reconheça um sítio de corte sobre o polimorfismo a ser estudado. Desta forma, se houver o alelo que faz parte do sítio de reconhecimento da enzima, o produto é cortado; se houver outro alelo, que altera o sítio, este passa a não ser reconhecido pela enzima e não ocorre o corte. Na figura 11 podemos ver a região estudada com sítios de anelamento dos *primers* e corte da enzima.

1. Sequência:

```

ATATCTGATGATTATAAAGTGCTTGCATTACCTCTGAAGCTGTATAGTGTATATGAAGG
TGGAGTTGGAGAGATGAGTTTTAAAGCGTATATTGCAAACCTAGGGCAACCACTAAAGAA
GTGAGACCCAGCCTCTAGAAAAAAGGAAATTAGCTATCAAGCCACGAAAA
GAAATGGAGGAACCTTAAACGCATATTTACTAACTGAGATACGTCACTTTGAAAAGGCTAC
AAACGGTGTCACTCCAACATATAACAATTTGGAAAAGGCCAAAGCATGGTGATGATAAA
AAGATCGGAGATGTCAGGGACTGGGGCAGGAGGGATGAGCAGGCAGAGCACGGTTTTCT
TTTCTCTTTTTAAGACAGTGAAAATACTCCTAGGATCCTGCAAGGAGGCTACAAATTA
CATACTTTGTCAAACCCACAGCATGTTGACCAAGGAGGAGACCCCATGTGACTCCA
GGACCCGTGGTTGATAACAACGTATCGAGATTCTCACATGGAACCAAGTGCCTCCTGTGG
TGGAGGGTGTACCTGTGTCTCAGGGCAGGGGTAAGTGGACATTTTTCTGCAGTTTTTGATCA
ATTTTGCAATGAACATAAATCTGTGGTATAAAAATAAAGTCTATTAAGAATCCAAAGGC
CCCTCTCATCTCACGATAAAGATAAAGTCCCCATCCATTTTACTCCTCTCAGCCCTGGAGA
AAGGAGTGGCCAGGTCCCACCCTTCCACCAGCAATGGACCCCCAGTCCAGACCCACGC
CTTTTCTCAGCATCCTCAGACCAGCAGGACTTGCAGCAATGGGGRAATTAGGCACCTGACT
TCTCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGGGCTCCAGCCTTGACCTTCGCTCTGAGAGTCTCA
GGCAGGTCCAGAGCCAGTCTCCCATGACGTGATATGTTCCAGAGCAGGTTCCTGGGTG
AGATAAAGGATTTGGGCTGAACAGGGTGGAGGGAGCATTGGAATGGCACTCAGGGCAAA
GGCAGAGGTGTGCGTGGCAGCCCTGGCTGTCCCTGCAAGGGCAGGGCACTGGGCAC
TAGAGCCGCTCGGGCCCTAGGACGGTCTGCGGTTTGAAGCCATGCCCCAGCATCCAGG
CAACAGGTGGCTGAGGCTGCTGCAGATCTGGAGGGAGCAGGGTTATGAGCACCTGCACCT
GGAGATGCACCAGACCTTCCAGGAGCTGGGGCCCATTTTCAGGTAAGCCCTCCCTGGCC
CTCGCTGGGAACACCCAGATCCCTGCCCTGTGCTCCAGGACCTGCCAGGCACCTCAGCA
CTGCCATTTCCAGCAGGTCCCGGCACTCTGCATCCTTTGGAGGATGGGGAAGGAGTGCAG
  
```

Primer Forward

-344 C/T

Primer Reverse

Exon 1

Sítios de restrição

Figura 11- Região de interesse do gene *CYP11b2*. Em laranja está marcado o *exon 1*. Em amarelo estão marcados os sítios de anelamento dos *primers* utilizados. Em azul está marcado o polimorfismo estudado. Os círculos indicam os sítios para a enzima de restrição *Hae III*

Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 5. A reação de PCR foi feita em termociclador (Gene Amp-PCR System 9700, Applied Biosystems, EUA), e se deu nas seguintes concentrações: tampão 1X (20mM Tris-HCl, 50mM KCl), mix dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP – cat. 10297-018, Invitrogen, EUA) 0,2mM, MgCl₂ 1,5mM, *Primer Forward* 0,5mM, *Primer Reverse* 0,5mM, enzima Taq Polimerase (cat. 11615-010, invitrogen, Brasil) 2,5 unidades (U), 2µL de DNA *template*. As condições do PCR foram: desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C;

1 minuto a 93°C, 1 minuto a 68°C, 1 minuto a 72°C (30 ciclos); e passo de extensão final de 7 minutos a 72°C. O produto de PCR foi checado em gel de agarose 1% (Agarose NA, Amersham, EUA), corado com brometo de etídio e visualizado através de transluminador acoplado a fotodocumentador (Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation Analysis System - EDAS 120, Kodak, EUA).

Tabela 5- *Primers* utilizados para amplificar região promotora do gene *CYP11b2*

Nome do <i>Primer</i>	Seqüência
<i>Primer forward</i>	5'- AGG CGT GGG GTC TGG ACT – 3'
<i>Primer Reverse</i>	5'- GTG TCA GGG CAG GGG GTA – 3'

Os produtos de PCR que amplificaram foram então digeridos por 2h com a endonuclease *Hae III* (cat. R0108SA, New England Biolabs, EUA) a 37°C (Banho-Maria, Fanem, Brasil), com posterior passo de inativação da enzima a 80°C (Temp-Blok Module Heater, American Scientific, EUA) por 20 minutos. A reação de digestão enzimática se deu nas seguintes concentrações: tampão NEBuffer2 1X (NaCl 50mM, Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM), enzima *Hae III* 6 U, 13,5µL de produto de PCR. Os produtos da digestão foram então separados por eletroforese em gel de agarose 3% (mistura 1:1 de agarose - agarose NA, Amersham, EUA - e agarose de alta resolução - METAPHOR, Lonza, EUA) à 115V por 45 minutos (fonte Power Pac Basic, Bio-Rad, EUA) e corados com brometo de etídio. O gel foi analisado em transluminador acoplado a fotodocumentador (EDAS 120, Kodak, EUA).

Foi utilizado um padrão de peso molecular de 50pb (cat. N3236S, New England BioLabs, EUA) para identificação dos tamanhos de peso molecular dos produtos de interesse através de comparação direta do padrão de corrida por eletroforese. Como vimos na figura B, existem dois sítios (seqüência GGCC) para

a enzima de restrição *Hae III* dentro do nosso produto de PCR. Um dos sítios sempre vai ser clivado uma vez que não é polimórfico. Este sítio gera dois fragmentos de 175 e 53pb. O outro sítio tem um polimorfismo. Desta forma, se o gene tem o alelo T, não há corte, gerando apenas as 2 bandas citadas anteriormente. Se houver um alelo C, cria-se o segundo sítio de restrição, causando o segundo ponto de clivagem, o que gera os fragmentos de 106, 69 e 53pb. Se o indivíduo for homocigoto TT, veremos apenas as bandas de 175 e 53pb. Se o indivíduo for homocigoto CC, veremos as bandas 106, 69 e 53pb. Se o indivíduo for heterocigoto, veremos as 4 bandas: 175, 106, 69 e 53pb. É interessante notar que o produto de PCR inteiro tem 228 pb, portanto o primeiro sítio de corte age como controle para a reação de digestão, uma vez que no caso de uma digestão incompleta, observaríamos a presença de uma banda de 228pb. Estes resultados podem ser observados na figura 12.

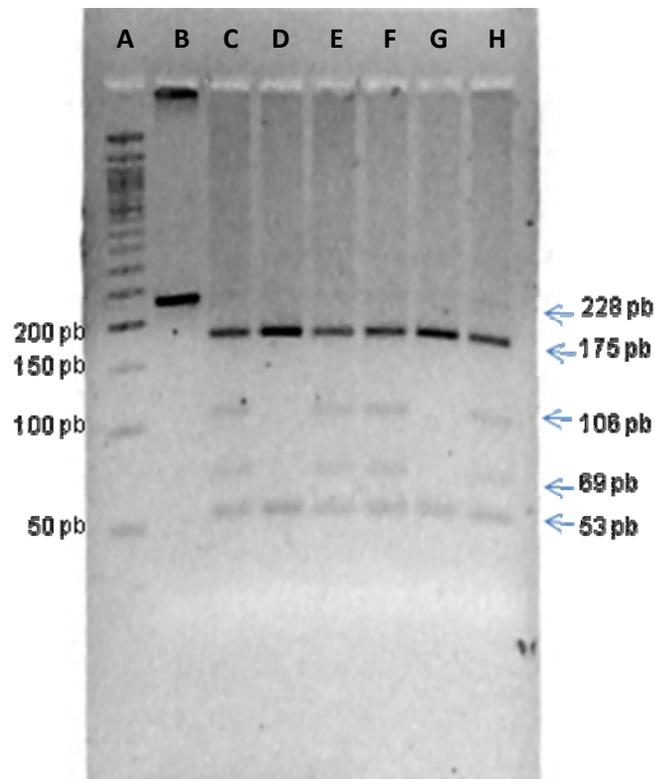


Figura 12- Digestão dos produtos de PCR do gene *CYP11b2*. Coluna A: marcador de peso molecular. Coluna B: Produto de PCR não digerido. Demais colunas: Produtos da digestão enzimática com enzima *Hae III*, sendo as colunas D e G homocigotos para o alelo T, e demais colunas heterocigotos. Indicados ao lado os tamanhos de peso molecular do marcador (esquerda) e dos produtos digeridos (direita).

3.10.3- Genotipagem do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1*

O polimorfismo 3435C/T do gene *MDR1* foi genotipado através da técnica de PCR alelo específico. Esta técnica funciona da seguinte maneira: é desenhado um *primer forward* a certa distância do polimorfismo de interesse e dois *primers reverse*, cada um destes tendo seu último nucleotídeo anelando exatamente sobre o polimorfismo. Para cada indivíduo são feitas duas reações de PCR, sendo que em cada uma o *primer forward* é o mesmo, enquanto que o

reverse é específico para determinado nucleotídeo em cada reação. Desta maneira, se houver um *mismatch*, ou seja, um não pareamento do último nucleotídeo do *primer reverse* com o nucleotídeo de polimórfico no DNA, ocorrerá uma dificuldade maior no anelamento do *primer reverse*, dificultando a amplificação do produto. Uma vez padronizada, a reação de PCR alelo específica não ocorre quando o indivíduo não carrega o alelo complementar ao *primer reverse* específico para aquele alelo.

Desta maneira, para cada paciente temos duas reações de PCR, uma que só amplifica na presença do alelo T no DNA e outra que só amplifica em presença do alelo C. Se ambas as reações amplificarem, o indivíduo é heterozigoto para aquele alelo. Se só amplificar a reação C, o indivíduo é homozigoto CC, e se ocorrer amplificação apenas na reação T, o indivíduo é homozigoto TT.

É necessário notar, porém, que a não amplificação de uma das duas reações poderia ocorrer por algum erro no método. Desta forma, desenhamos um terceiro *primer reverse* para agir como controle interno. Ele se situa deslocado aproximadamente 20 pb *downstream* em relação ao *primer* alelo específico. Desta forma, juntamente com o *primer forward*, ele é capaz de sempre amplificar um produto de PCR maior que o produto alelo específico, independentemente do alelo contido no polimorfismo. Observamos então duas bandas em cada reação de PCR: uma maior, sempre presente em ambas as reações de cada indivíduo, e uma menor, que amplifica dependendo da presença do alelo. Na figura 13 podemos ver a seqüência da região de interesse do gene *MDR-1*.



Figura 13- Região de interesse no gene *MDR-1*. Em laranja está marcado o *exon* 26. Em amarelo estão marcados os sítios de anelamento dos *primers forward* e o *reverse* de controle interno. Os *primers* alelo específicos anelam na região sublinhada. Em azul, no círculo está marcado o polimorfismo estudado.

Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 6. A reação de PCR se deu nas seguintes concentrações: tampão 1X (20mM Tris-HCl, 50mM KCl), mix dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 0,2mM, MgCl₂ 2mM, *Primer Forward* (Ex26Fw) 0,3µM, *Primer reverse* de controle interno (Ex26Rv) 0,06 µM, *Primer reverse* alelo específico C (3435Crv) ou T (3435Trv) 0,25 µM, enzima Taq Polimerase 1 U, 2 µL de DNA *template*. As condições do PCR foram: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; 10 ciclos de desnaturação (30 segundos à 94°C), anelamento (30 segundos à 61°C) e extensão (20 segundos à 72°C), seguidos por 25 ciclos de desnaturação (30 segundos à 94°C), anelamento (30 segundos à 55°C) e extensão (20 segundos à 72°C), sem passo de extensão final.

Tabela 6- *Primers* utilizados para genotipagem do gene *MDR-1*

Nome do <i>Primer</i>	Seqüência
<i>Primer Ex26Fw</i>	5'- TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG - 3'
<i>Primer Ex26Rv</i>	5'- AAG GCA TGT ATG TTG GCC TC - 3'
<i>Primer 3435Crv</i>	5'- CTT TGC TGC CCT CAC G - 3'
<i>Primer 3435Trv</i>	5'- CTT TGC TGC CCT CAC A - 3'

O produto de PCR foi resolvido por eletroforese em gel de agarose 3% (Agarose NA, Amersham, EUA) à 115V por 45 minutos, corado com brometo de etídio e visualizado usando transluminador acoplado a fotodocumentador (EDAS, Kodak, EUA). Na figura 14, podemos ver um exemplo dos resultados da genotipagem.

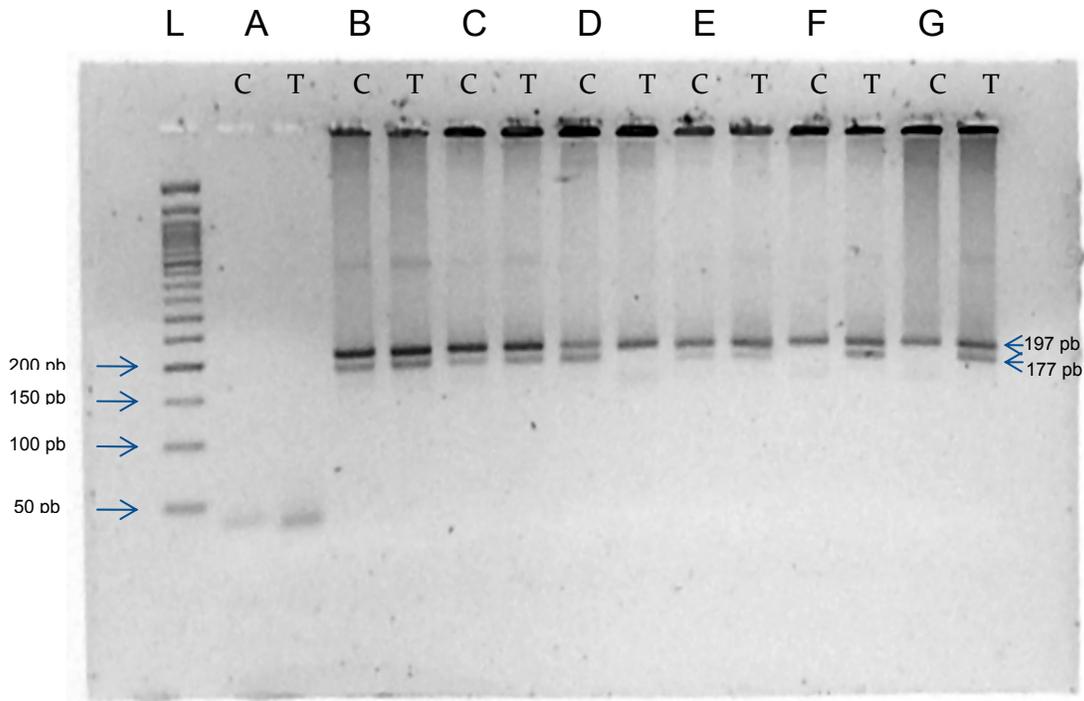


Figura 14- Genotipagem do gene *MDR-1*. Para cada indivíduo foram realizadas duas reações de PCR: C e T. A banda de 197 pb corresponde ao controle interno, e a banda de 177 pb corresponde ao produto alelo específico. **Coluna L:** marcador de peso molecular. **Coluna A:** Branco. **Colunas B, C e E:** indivíduos heterozigotos CT. **Coluna D:** homozigoto CC. **Colunas F e G:** homozigoto TT. Indicados ao lado, os tamanhos em pb do marcador de peso molecular (esquerda) e dos produtos de interesse (direita).

3.11- Estatística

3.11.1- Análise descritiva

Com objetivo de apenas caracterizar as amostras estudadas, apresentamos, em forma de gráficos e tabelas, as freqüências relativas (percentuais) e das classes de cada variável qualitativa. Para as variáveis quantitativas, foram utilizados: tamanho da amostra (N), a média e o erro-padrão, para indicar a variabilidade dos dados.

3.11.2- Análise inferencial

Para comparar as distribuições nas frequências alélicas e genóticas entre os grupos foi utilizado o teste Qui-Quadrado (χ^2). Para verificar se as distribuições genóticas seguiam o equilíbrio de Hardy-Winberg, também foi usado o teste χ^2 .

Para comparação de variáveis numéricas entre os grupos de genótipos, foi utilizada a Análise de Variância Simples (One-way ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de $p < 0,05$.

Foram utilizados para os cálculos estatísticos os seguintes softwares: MS Excel (Office 2007 Home and Student, Microsoft, EUA) para gerenciamento do banco de dados, cálculos de médias e erro padrão, elaboração e edição de gráficos; Prism (versão 3.0, GraphPad, EUA) para execução de cálculos estatísticos; MS Word (Office 2007 Home and Student, Microsoft, EUA) para elaboração de tabelas e redação; EndNote (versão 9, Thomson, EUA) para gerenciamento de referências bibliográficas.

4- RESULTADOS

A seguir serão descritos os resultados com as devidas explicações de cada comparação. Na tabela 7, estão apresentadas as características clínicas dos grupos estudados. Nas figuras 15 e 16 podemos ver a caracterização do tratamento farmacológico dado aos pacientes estudados.

Tabela 7- Características dos grupos Controle, HT e HAR

	Controle	HT	HAR	P	P'	Valores de Referência
Sexo (M/F)	42,2%/57,8%	32%/68%	32%/68%	CT x HT = 0,1215 CT x HAR = 0,1347 HT x HAR = 0,9922	-	-
Raça (B/N)	53%/47%	71,3%/28,7%	55,4%/44,6%	CT x HT = 0,0093* CT x HAR = 0,7554 HT x HAR = 0,0231*	-	-
Idade (Anos)	45,3±7,7	50,6±14,1	50,6±9,9	0,0003*	CT x HT = 0,0017* CT x HAR < 0,0001* HT x HAR = 0,9844	-
PAS (mmHg)	116±12	133,5±22,9	158,5±20,6	< 0,0001*	CT x HT < 0,001* CT x HAR < 0,001* HT x HAR < 0,001*	<140
PAD (mmHg)	80±8	82,8 ± 12,9	97,0±14,2	<0,0001*	CT x HT > 0,05 CT x HAR < 0,001* HT x HAR < 0,001*	<90
Colesterol (mg/dL)	-	198,6±34,4	193,2±47,7	0,3765	-	200 – 239 ¹
Triglicérides (mg/dL)	-	147,8±74,5	158,2±113,1	0,458	-	<150 ²
HDL (mg/dL)	-	46,7±11,8	44,4±11,7	0,208	-	≥40 ³
LDL (mg/dL)	-	122,3±30,4	122,6±40,1	0,9517	-	<130 ⁴
Glicemia (mg/dL)	-	99,6±30,6	99,7±15,9	0,987	-	60 -100 ⁵
IMC (kg/m²)	-	28,8 ± 4,8	31,4 ± 6,3	0,0004*	-	-
Número de Anti-Hipertensivos (un)	-	2,0 ± 0,8	3,6 ± 1,1	<0,0001*	-	-

Valores de médias ± Desvio Padrão; P= valores de P dos testes de qui quadrado ou de ANOVA de uma via; P' = valores de P dos testes * = estatisticamente significativo; ¹ = risco limítrofe para doença coronariana (DC); ² = desejável para adultos; ³ = acima deste valor há risco de DC; ⁴ = acima deste valor, risco levemente aumentado para DC; ⁵ = valores normais que constam nos exames laboratoriais.

Número de classes de anti-hipertensivos utilizadas nos grupos HT e HAR

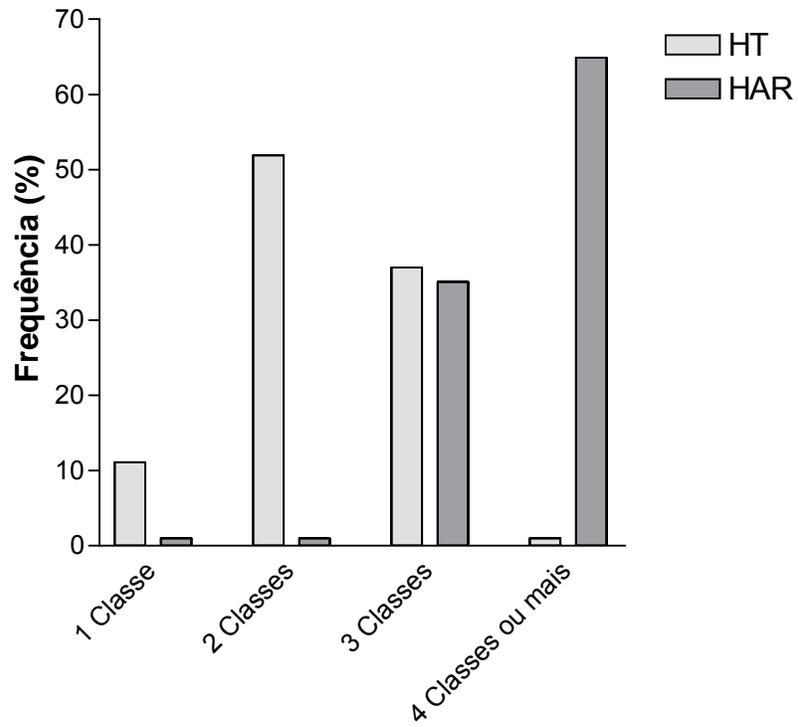


Figura 15- Percentual de pacientes estudados utilizando combinações de até sete classes de anti-hipertensivos diferentes

**Percentual de pacientes
utilizando diferentes classes
de anti-hipertensivos nos
grupos HT e HAR**

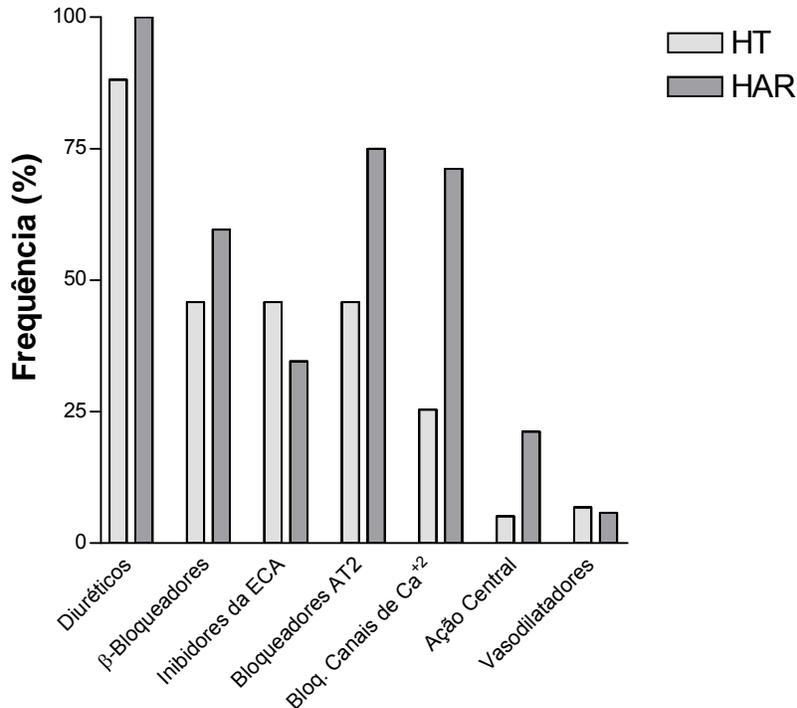


Figura 16- Percentual de pacientes HT e HAR utilizando cada classe de medicamento

4.1- Frequência genotípica do gene *CYP11b2*

Para a análise dos genótipos deste gene, foram incluídos 88 hipertensos refratários, 142 hipertensos responsivos e 110 indivíduos normotensos. Na figura 17 podemos ver a distribuição dos genótipos, e na figura 18 podemos ver a distribuição dos alelos. Todas as distribuições genotípicas dos diferentes grupos obedeceram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, como mostrado na tabela 8.

Freqüência Genotípica do gene *CYP11b2* entre os Grupos de Pacientes

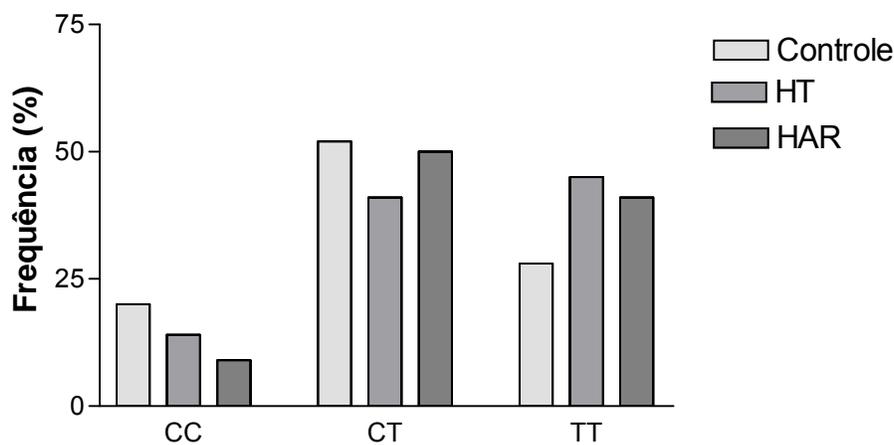


Figura 17- Freqüência genotípica do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* nos grupos controle, HT e HAR. Há diferença estatística entre grupos controles e HT ($p= 0,0221$), e entre os grupos controles e HAR ($p=0,0448$). Não houve diferença entre grupos HT e HAR ($p= 0,3079$)

Tabela 8- Equilíbrio de Hardy-Weinberg do gene *CYP11b2*.

Grupo	Equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor de P)
Controles	1
HT	0,737
HAR	0,7919

Freqüência Alélica do gene *CYP11b2* x Grupos de Pacientes

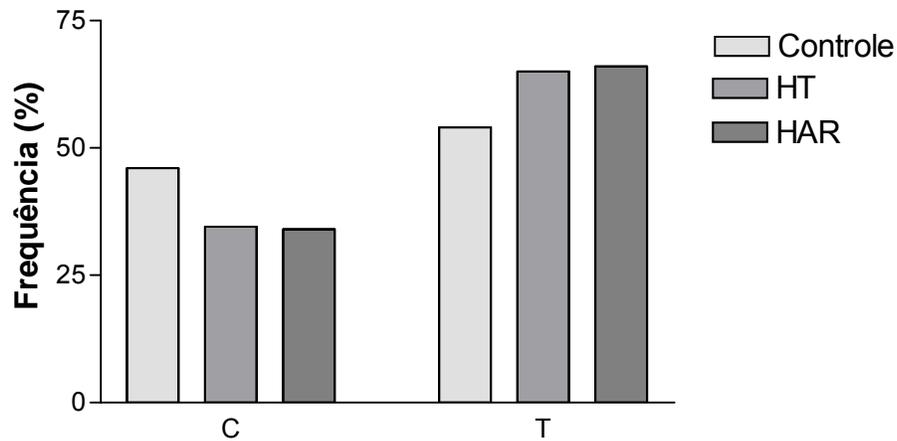


Figura 18- Freqüência alélica do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* entre os grupos controles, HT e HAR. Há diferença estatística entre os grupos controles e HT ($p= 0,0094$) e entre os grupos controle e HAR ($p= 0,0174$). Não houve diferença entre grupos HT e HAR ($p=0,9272$)

4.1.1- Influência dos alelos sobre parâmetros clínicos

Verificou-se se estes genótipos eram capazes de alterar parâmetros bioquímicos em indivíduos hipertensos responsivos e refratários ($n=78$); os grupos estão caracterizados na tabela 5. Os indivíduos foram separados entre os três genótipos, CC, CT e TT. Nas figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, estão apresentadas as comparações de PAS e PAD; aldosterona, renina, e cortisol plasmáticos; EIM; VOP e número de classes diferentes de anti-hipertensivos, respectivamente, entre os grupos genotípicos. Não foram encontradas alterações significativas em nenhum destes parâmetros entre os grupos CC, CT e TT.

Tabela 9- Características dos grupos HT e HAR incluídos para a comparação dos parâmetros clínicos e de remodelamento cardiovascular entre grupos de alelos dos genes *CYP11b2* e *MDR-1*

	Hipertensos (HT)	Hipertensos Refratários (HAR)	P	Valores de Referência
Sexo (M/F)	9/27	12/30	0,8011	-
Idade (anos)	54,3 ± 11,3	53,3 ± 10,3	0,6839	-
IMC (kg/m²)	29,7 ± 4,9	32,5 ± 7,18	0,052	-
PAS (mmHg)	138,4 ± 13,8	158,5 ± 18,1	< 0,0001 *	<140 ¹
PAD (mmHg)	89,2±8,0	98,6±8,6	< 0,0001 *	<90 ¹
Aldosterona (pg/mL)	17,7 ± 10,7	16,3 ± 8,3	0,5378	10 - 160 ³
Renina (pg/mL)	3,4 ± 6,2	4,7 ± 7,5	0,4069	2,4 - 21,6 ³
Cortisol (µg/dL)	14 ± 7,6	12,7 ± 4,4	0,3623	5-25 ³
EIM (mm)	0,51 ± 0,11	0,75 ± 0,15	< 0,0001 *	< 0,71 ²
VOP (m/s)	8,9 ± 1,2	9,3 ± 1,7	0,2305	Jovens: 8 m/s Idosos: 12m/s
Nº Anti- Hipertensivos (un)	2,7 ±1,0	3,6 ±1,1	0,0009 *	<3 / ≥3 ¹

Valores de médias ± Desvio Padrão; *= estatisticamente significativo; ¹= Chobanian, Bakris *et al.*, 2003; ²= (Lim, Lim *et al.*, 2008)(119); ³=Valores normais que constam nos exames laboratoriais

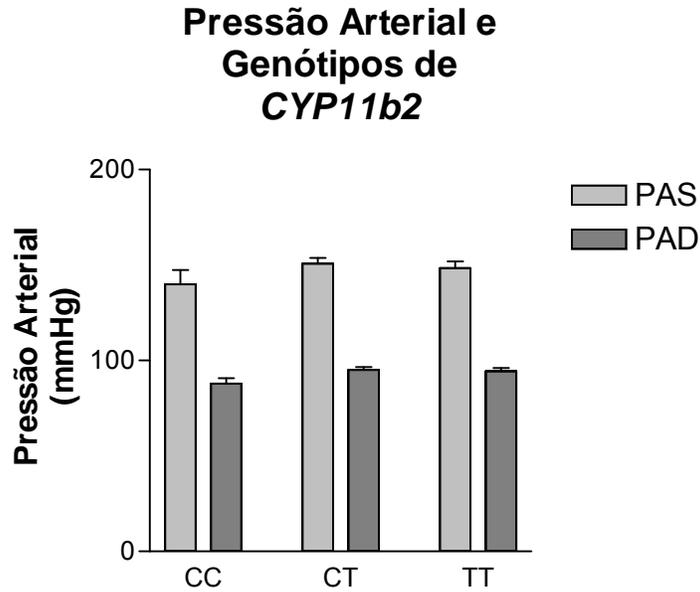


Figura 19- Níveis de Pressão Arterial Sistólica e Diastólica entre os genótipos do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* (ns; PAS P=0,4505; PAD P=0,2267)

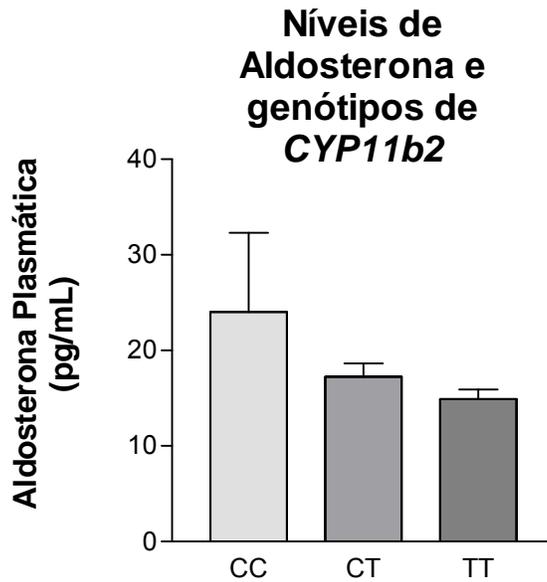


Figura 20- Níveis plasmáticos de aldosterona entre os genótipos do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* (ns, P=0,0918)

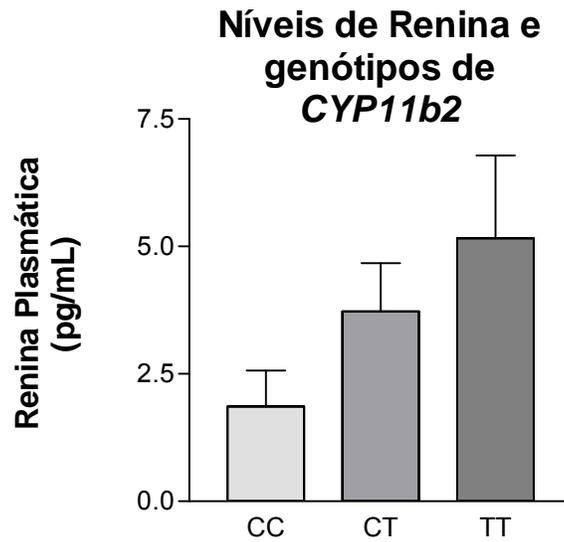


Figura 21- Níveis plasmáticos de renina entre os genótipos do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* (ns; $P=0,5036$)

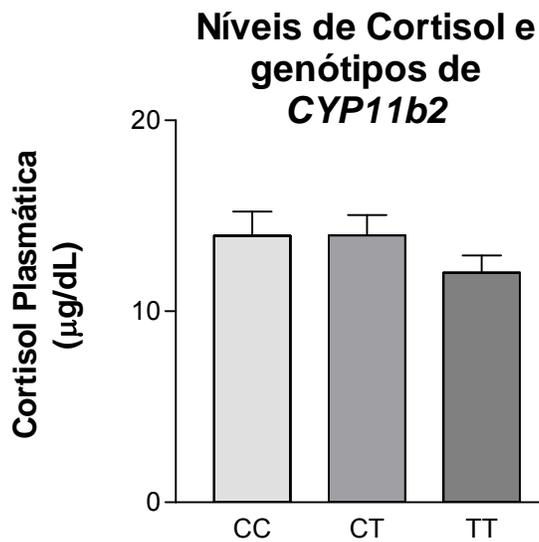


Figura 22- Níveis plasmáticos de cortisol entre os genótipos do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* (ns; $P=0,4129$)

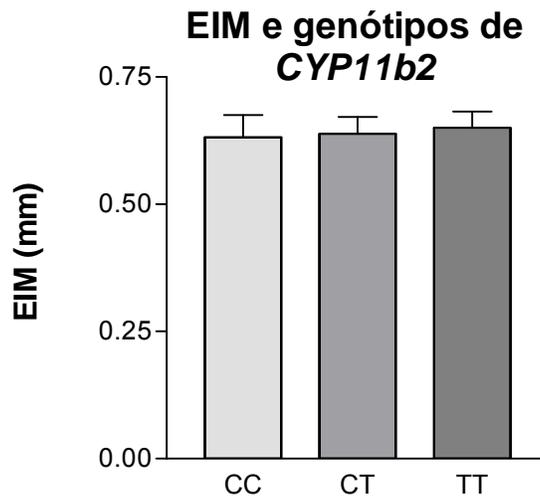


Figura 23- Valores de espessura da íntima média de carótida entre os genótipos do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* (ns; P= 0,9565)

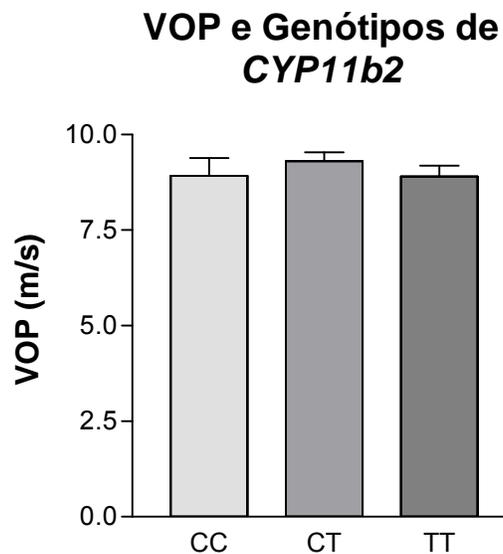


Figura 24- Valores de velocidade de onda de pulso entre os genótipos do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* (ns; P= 0,5265)

Número de Medicamentos e Genótipos de *CYP11b2*

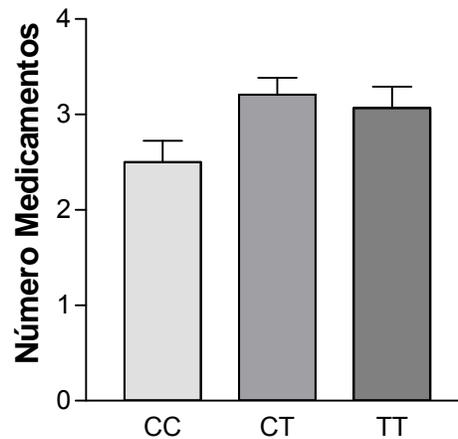


Figura 25- Número de classes de anti-hipertensivos diferentes entre os genótipos do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* (ns; P=0,3551)

4.2- Ensaio preliminar da freqüência genotípica do gene *MDR-1*

Foram avaliados, de maneira preliminar, os genótipos 3435C/T do gene *MDR-1* entre os grupos controle (n=50), HT (n=36) e HAR (n=42). As distribuições dos genótipos estão demonstradas na figura 26, e na figura 27 estão apresentadas as distribuições alélicas. Todas as distribuições genotípicas dos diferentes grupos obedeceram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, como mostrado na tabela 10.

Tabela 10- Equilíbrio de Hardy-Weinberg do gene *MDR-1*

Grupo	Equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor de P)
Controles	0,2501
HT	0,8893
HAR	0,5256

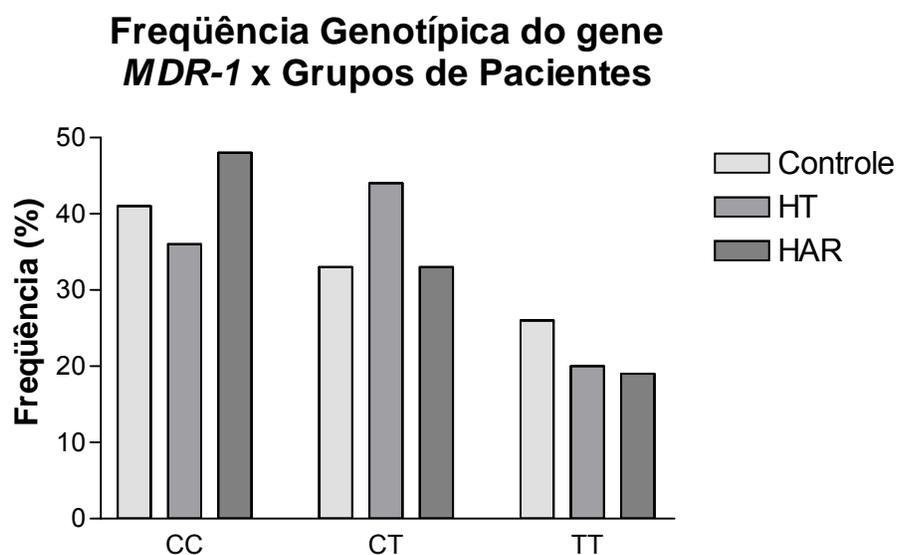


Figura 26- Freqüência genotípica do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1* nos grupos controle, HT e HAR. Não há diferença estatística entre as três distribuições (Controles x HT $P=0,5149$; Controles x HAR $P=0,6737$; HT x HAR $P=0,5405$).

Freqüência Alélica do Gene *MDR-1* x Grupos de Pacientes

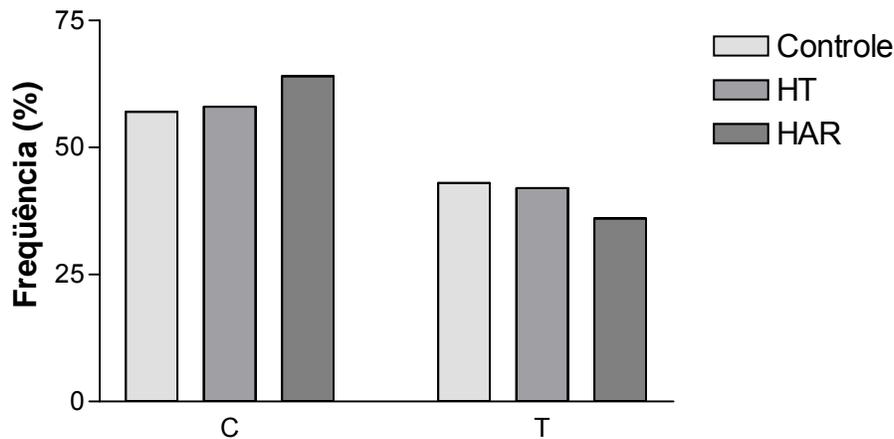


Figura 27- Freqüência alélica do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1* entre os grupos controles, HT e HAR. Não há diferença estatística entre as distribuições alélicas (Controles x HT $P=0,8766$; Controles x HAR $P=0,3259$; HT x HAR $P=0,4462$)

4.2.1- Influência dos alelos sobre parâmetros clínicos

Foi verificado se estes genótipos eram capazes de alterar parâmetros bioquímicos em indivíduos hipertensos ($n = 78$); os grupos estão caracterizados na tabela 9. Os indivíduos foram separados entre os três grupos de genótipos, CC, CT e TT. Nas figuras 28, 29, 30, 31, 32, 33 e 34, são apresentadas as comparações dos valores de PAS e PAD; aldosterona, renina, e cortisol plasmáticos; EIM; VOP e número de classes diferentes de anti-hipertensivos, respectivamente, entre os grupos genotípicos.

Níveis de Pressão Arterial entre Genótipos de *MDR-1*

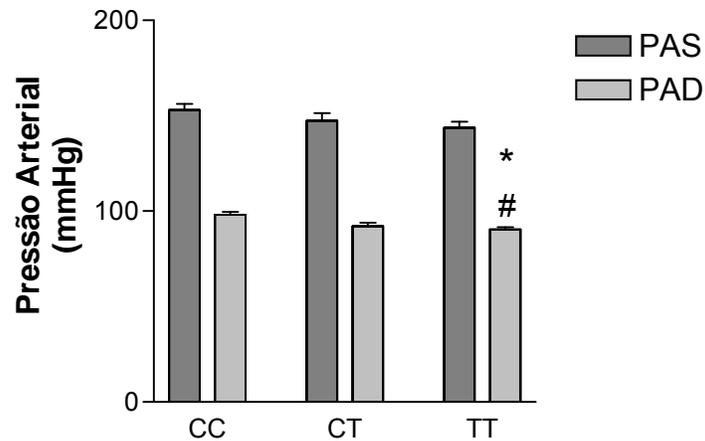


Figura 28- Níveis de pressão arterial sistólica e diastólica entre os grupos de genótipos. Não há diferença entre as PAS ($P=0,2487$). Há diferença estatística entre as PAD ($P=0,0069$), entre os grupos CC e TT ($*P<0,05$) e entre os grupos CT e TT ($\#P<0,05$). Não há diferença entre os grupos CC e CT ($P>0,05$).

Uma vez que foi encontrada diferença significativa entre a PAD entre os grupos, decidiu-se investigar os genótipos dos grupos HT e HAR separadamente para descobrir se era algo comum aos grupos HT ($n=36$; Figura 29) e HAR ($N=42$; Figura 30).

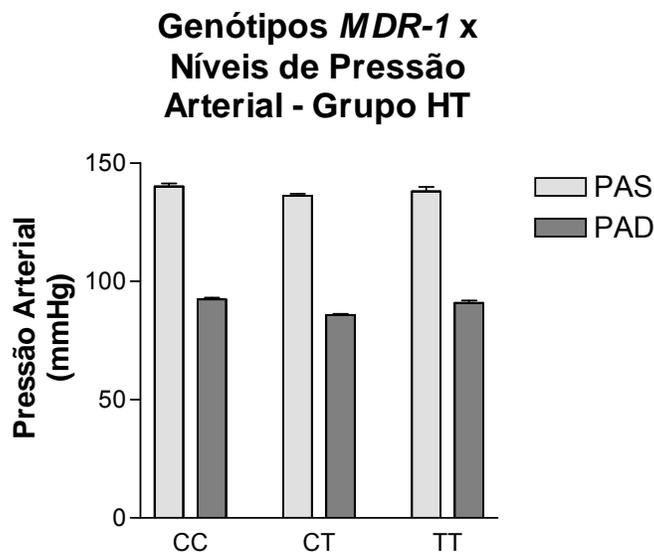


Figura 29- Níveis de pressão arterial sistólica e diastólica entre os grupos de genótipos (apenas pacientes HT). Não há diferença estatística entre os grupos em relação à PAS ($P=0,7562$) nem à PAD ($P=0,070$)

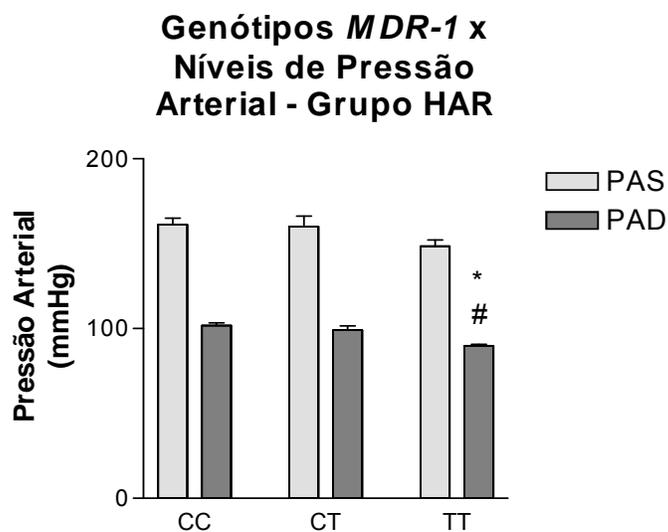


Figura 30- Níveis de pressão arterial sistólica e diastólica entre os grupos de genótipos (apenas pacientes HAR). Não há diferença entre as PAS ($P=0,2744$). Há diferença estatística entre as PAD ($P=0,0042$), entre os grupos CC e TT ($*P<0,01$) e entre os grupos CT e TT ($\#P<0,05$). Não há diferença entre os grupos CC e CT ($P>0,05$).

Foi investigado o percentual de indivíduos Hipertensos que usavam algum medicamento relatado na literatura por ter sua biodisponibilidade afetada pelo *MDR-1* (Verapamil, Diltiazem, e Losartan são distribuídos aos pacientes em nosso ambulatório): 58,3% dos pacientes HT, e 90,54% dos HAR ($p < 0,0001$) usaram tais medicamentos. Sobre os demais parâmetros, não houve alterações significativas.

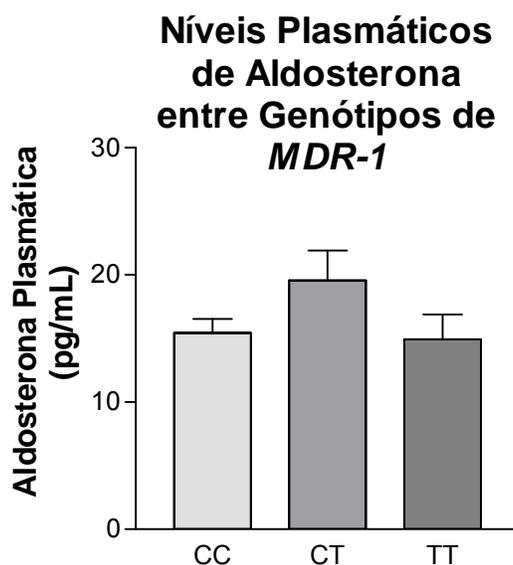


Figura 31- Níveis plasmáticos de aldosterona entre os genótipos do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1* (ns; $P=0,1644$)

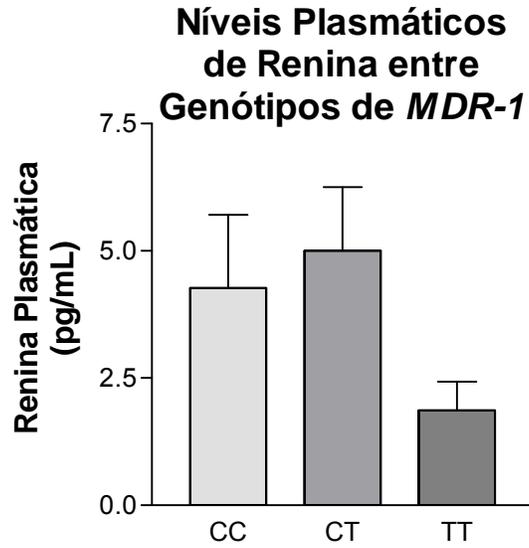


Figura 32- Níveis plasmáticos de renina entre os genótipos do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1* (ns; $P=0,3805$)

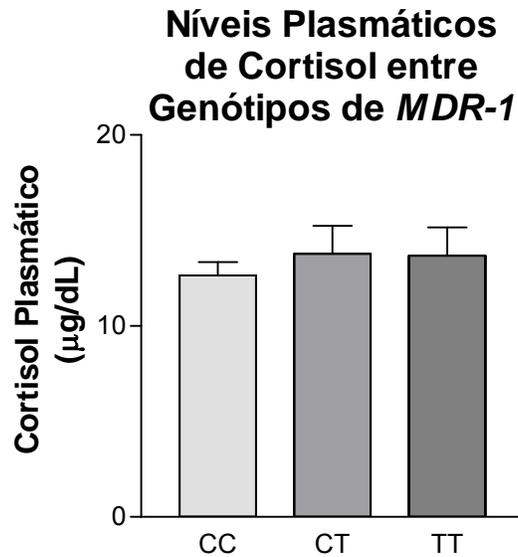


Figura 33- Níveis plasmáticos de cortisol entre os genótipos do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1* (ns; $P=0,7382$)

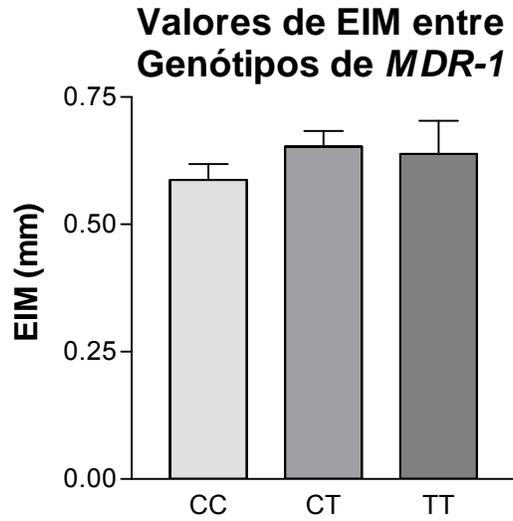


Figura 34- Valores de EIM entre os genótipos do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1* (ns; $P=0,3597$)

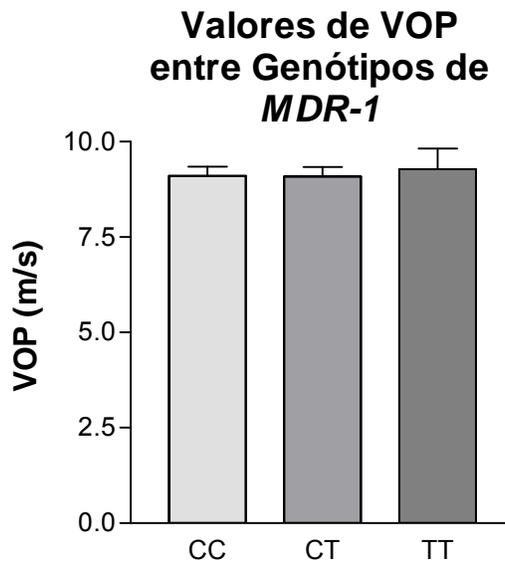


Figura 35- Valores de VOP entre os genótipos do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1* (ns; $P=0,9185$)

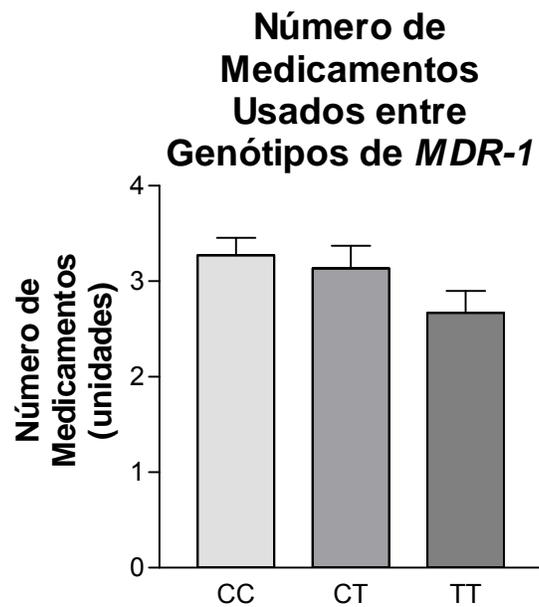


Figura 36- Número de classes diferentes de anti-hipertensivos entre os genótipos do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1* (ns; $P=0,2280$)

5- DISCUSSÃO

Os grupos de pacientes tiveram características próximas, tanto na idade, como nos parâmetros bioquímicos, apesar de haver uma diferença estatística entre os IMC dos grupos HT e HAR. Houve também diferença entre a proporção de brancos e negros no grupo HT, sendo os grupos controle e HAR mais próximos entre si. Em relação à EIM houve diferença significativa, com maior EIM no grupo HAR, como previamente publicado por nosso grupo (66). Na sub-análise dos níveis de aldosterona, renina, cortisol, VOP e EIM, selecionamos os pacientes de tal forma que se mantiveram estatisticamente diferentes apenas os parâmetros que por critério de diagnóstico realmente deveriam ser diferentes (PAS, PAD, EIM e número de medicamentos).

Neste estudo foram encontrados dois resultados importantes:

- 1- Apesar de não alterar os parâmetros clínicos dos pacientes, o alelo T do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* está relacionado à hipertensão;
- 2- Não há relação entre o alelo T e a resistência farmacológica ao tratamento anti-hipertensivo (fenótipo de hipertensão refratária).

Não foram observadas influências significativas dos genótipos sobre os hormônios circulantes. Estes hormônios são de difícil dosagem, uma vez que se encontram em concentrações muito baixas no sangue. Além disso, houve razoável variação nas quantificações tanto intra-indivíduo como inter-indivíduos. A aldosterona, por exemplo, é um hormônio com alta flutuação diária, podendo ter sua liberação alterada por fatores como stress, cansaço, ingestão de sal, e até mesmo a posição do paciente, sentado ou em pé, durante a coleta de sangue; desta forma, como foi sugerido por Biolo e colaboradores (87) seria mais racional investigar as alterações fisiológicas causadas pela aldosterona em vez de sua concentração plasmática. Além disso, é possível que a influência dos genótipos se dê de forma aguda na liberação de aldosterona mediada por estímulo fisiológico, portanto não refletindo em concentrações plasmáticas de aldosterona permanentemente aumentadas. Em relação à ingestão de sal (conhecido fator de estímulo para a liberação de aldosterona), uma das medidas não-farmacológicas

praticadas em nosso ambulatório é o estímulo à adoção de dietas hipossódicas pelos nossos pacientes, desta forma, podemos não ter encontrado a influência dos alelos do gene *CYP11b2* sobre a concentração de aldosterona plasmática reportados por Iwai e colaboradores (88) porque este grupo estudou indivíduos com alta ingestão de sódio.

Além disso, não foi observado em nossa amostra, o fenômeno descrito por Freel e colaboradores onde o alelo T deste polimorfismo estaria relacionado a maiores níveis plasmáticos de Cortisol (94). Isto poderia ter ocorrido por uma combinação de fatores, sendo pelo fato do número de indivíduos analisados ser reduzido, e pela alta variabilidade nos níveis de hormônios circulantes.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de remodelamento cardiovascular (VOP e EIM) entre os grupos de alelos. A distância superficial medida entre as artérias carótida e femoral constitui o maior erro na VOP. De fato, a medida superficial não invasiva é apenas uma estimativa; métodos precisos desta distância usam necessariamente procedimentos invasivos (75). A maior dificuldade ocorre em determinar tal distância em obesos, já que poderia levar a uma superestimativa da distância, e conseqüentemente, da VOP (75). Não foi encontrada diferença nos valores de PAS, PAD, e número de medicamentos utilizados entre os alelos estudados do gene *CYP11b2*.

Em relação ao gene *MDR-1* foi realizado um estudo piloto com um número menor de indivíduos a fim de verificar se há alguma evidência de influência sobre a resistência ao tratamento anti-hipertensivo. Observamos, no início do estudo, duas possibilidades deste gene influenciar o fenótipo de HAR através da modulação da expressão de seu produto, a p-glicoproteína:

- a- Atuando sobre a liberação, distribuição para os tecidos, e excreção renal da aldosterona, desta forma podendo atuar sobre a manutenção de um excesso de volume plasmático, ou sobre os efeitos de remodelamento vascular arterial. O alelo C (maior expressão da PGP) poderia estar relacionado à maior

liberação aguda de aldosterona pela glândula supra-renal. O alelo T (menor expressão da PGP) poderia estar relacionado a uma maior captação tecidual da aldosterona (e conseqüentemente maior suscetibilidade aos efeitos de remodelamento cardiovascular mediados pela aldosterona e angiotensina II), e a um maior tempo de meia vida plasmático da aldosterona, uma vez que haveria menor taxa de transporte ativo renal.

- b-** Atuando sobre a biodisponibilidade dos tratamentos anti-hipertensivos, reduzindo a absorção dos mesmos, e potencialmente tornando a terapia ineficaz (alelo C). Em nosso ambulatório são adotados três fármacos que podem ser transportados pela PGP: Diltiazem, Verapamil, e Losartan (96).

Não foi encontrada associação entre nenhum destes alelos e hipertensão, e nem hipertensão refratária. Desta forma, aparentemente estes alelos não estão causando os fenótipos estudados. Entretanto, encontramos uma diferença significativa na PAD entre os grupos com o alelo C (CC e CT) e o grupo sem alelo C (TT).

Analisaram-se, os genótipos dos indivíduos HT e HAR separadamente para verificar se ambos os grupos apresentavam o mesmo efeito sobre a PAD. Surpreendentemente, ao olharmos os genótipos do grupo HT, esta diferença na PAD não é significativa. Ao olharmos os genótipos do grupo HAR, podemos ver que qualquer grupo carregando alelo C (relacionado na literatura a maior expressão da PGP) tem pressão diastólica aumentada em relação ao grupo sem alelo C (homozigotos TT). Uma expressão aumentada da PGP poderia estar relacionada a uma resistência farmacológica aos tratamentos anti-hipertensivos (reduzindo a absorção intestinal de fármacos transportados pela PGP e aumentando a excreção renal e hepática dos mesmos, modulando assim sua biodisponibilidade). De fato, quando analisamos o número de classes de medicamentos, vemos um número aumentado nos HAR (condizente até mesmo com o critério de diagnóstico). O interessante é que quando analisamos os indivíduos que carregam o alelo C, uma porcentagem significativamente maior de HAR usa medicamentos transportados pela PGP em comparação com o grupo

HT. O alelo C pode não ser o causador da HAR, uma vez que não observamos diferença na distribuição genotípica, porém observamos indício de que este alelo pode estar relacionado a uma resistência medicamentosa em parte dos HAR.

Esperávamos uma alteração na EIM e na VOP principalmente se nossa hipótese de ligação do alelo T do *MDR-1* com o fenótipo de hipertensão refratária se confirmasse, uma vez que significaria uma maior suscetibilidade do tecido-alvo à ação da aldosterona. Na realidade não encontramos nem associação do alelo com o fenótipo de resistência medicamentosa, com alterações funcionais em relação ao remodelamento cardiovascular, nem com o número de anti-hipertensivos utilizado.

Enfim, como pontos fortes deste estudo podem-se citar os critérios de diagnóstico de HAR e a extensiva investigação dos fatores de confusão. No ambulatório é feito um acompanhamento destes pacientes, com avaliação da adesão ao tratamento, sendo os pacientes não aderentes, excluídos da casuística; avaliação de “hipertensão de jaleco branco”, onde é feita mensuração da PA domiciliar, e MAPA 24h para determinar corretamente se o indivíduo é hipertenso; avaliação de hipertensão secundária, onde são feitos exames de alta complexidade (se necessário) para excluir pacientes com tumor da glândula adrenal, ou com nefropatias, por exemplo; otimização do tratamento farmacológico, com personalização da prescrição medicamentosa para cada paciente, evitando interações farmacológicas e sub-dosagens.

Como limitações deste estudo, pode ser citado o baixo número de pacientes. Apesar da hipertensão ser uma doença relativamente comum, existe uma grande dificuldade no diagnóstico de hipertensão refratária, devido aos inúmeros fatores de confusão associados (tabagismo, obesidade, etilismo, dentre outros), e isto acaba acarretando em um número restrito de indivíduos devidamente caracterizados.

A classificação dos pacientes em negros e brancos não reflete a diversidade genética contida em nossa população. Além de Caucasianos e Africanos, nosso país têm parcelas significativas de Asiáticos, Índios,

e outras populações. Não apenas a diversidade genética é grande, mas há grande miscigenação entre as diversas raças, tornando nossa população uma das mais diversificadas em termos genéticos em todo o mundo. Para tentar contornar este problema, preferimos genotipar indivíduos controle de nossa própria população, evitando a comparação direta das distribuições genotípicas dos grupos HT e HAR com distribuições genotípicas já publicadas na literatura internacional.

Quando são comparadas as distribuições genotípicas obtidas do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* em nosso grupo controle com dados na literatura de outras populações normotensas, observamos que nossa população está muito mais próxima a populações caucasianas, do que a populações orientais ou africanas, mesmo tendo sido estudado neste trabalho um grupo controle com uma distribuição de brancos e negros de praticamente 50% cada. O mesmo fenômeno é observado quando são analisadas as frequências alélicas do polimorfismo 3435C/T do gene *MDR-1*, onde encontramos uma frequência ligeiramente maior do alelo C (57%), quando em populações africanas, este alelo é muito mais freqüente (em torno de 90%). Esta observação é reflexo da ampla miscigenação presente em nosso país, como comentado anteriormente, portanto acreditamos que isto torne menos importante o fato do grupo HT ter proporção de negros/brancos diferente dos demais grupos estudados.

6- CONCLUSÕES

As conclusões principais do estudo foram:

- O alelo T do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* pode estar associado à hipertensão, mas não à hipertensão refratária.

As conclusões secundárias do estudo foram:

- Alelo T do polimorfismo -344C/T do gene *CYP11b2* não parece alterar parâmetros clínicos nos hipertensos;
- Não parece haver diferença entre frequências alélicas do polimorfismo 3435 do gene *MDR-1* entre os grupos estudados.

Há indícios que o alelo C do polimorfismo 3435 do gene *MDR-1* esteja associado à maior PAD em hipertensos refratários, possivelmente por resistência farmacológica.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Cutler JA. High blood pressure and end-organ damage. *J Hypertens Suppl.* 1996 Dec;14(6):S3-6.
2. Kannel WB. Historic perspectives on the relative contributions of diastolic and systolic blood pressure elevation to cardiovascular risk profile. *Am Heart J.* 1999 Sep;138(3 Pt 2):205-10.
3. Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension: Blood pressure measurement. Part II-conventional sphygmomanometry: technique of auscultatory blood pressure measurement. *Bmj.* 2001 Apr 28;322(7293):1043-7.
4. Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension. Blood pressure measurement. Part I-sphygmomanometry: factors common to all techniques. *BMJ.* 2001 Apr 21;322(7292):981-5.
5. O'Brien E, Beevers G, Lip GY. ABC of hypertension: Blood pressure measurement. Part IV-automated sphygmomanometry: self blood pressure measurement. *BMJ.* 2001 May 12;322(7295):1167-70.
6. O'Brien E, Beevers G, Lip GY. ABC of hypertension. Blood pressure measurement. Part III-automated sphygmomanometry: ambulatory blood pressure measurement. *BMJ.* 2001 May 5;322(7294):1110-4.
7. Psaty BM, Manolio TA, Smith NL, Heckbert SR, Gottdiener JS, Burke GL, et al. Time trends in high blood pressure control and the use of antihypertensive medications in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med.* 2002 Nov 11;162(20):2325-32.
8. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., 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.* 2003 May 21;289(19):2560-72.

9. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2008 Jun 24;117(25):e510-26.
10. Hajjar I, Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. *JAMA*. 2003 Jul 9;290(2):199-206.
11. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA*. 2002 Dec 18;288(23):2981-97.
12. Lloyd-Jones DM, Evans JC, Larson MG, O'Donnell CJ, Roccella EJ, Levy D. Differential control of systolic and diastolic blood pressure : factors associated with lack of blood pressure control in the community. *Hypertension*. 2000 Oct;36(4):594-9.
13. Brown MA, Buddle ML, Martin A. Is resistant hypertension really resistant? *Am J Hypertens*. 2001 Dec;14(12):1263-9.
14. Hermida RC, Ayala DE, Calvo C, Lopez JE, Mojon A, Fontao MJ, et al. Effects of time of day of treatment on ambulatory blood pressure pattern of patients with resistant hypertension. *Hypertension*. 2005 Oct;46(4):1053-9.
15. Yugar Toledo JFM, SE; Toreta, LIM; Moreno Jr, H. Hipertensão Refratária: Diagnóstico e Tratamento. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*. 2003;13(1):164-75.
16. Frohlich ED. Classification of resistant hypertension. *Hypertension*. 1988 Mar;11(3 Pt 2):II67-70.

17. Gifford RW, Jr. An algorithm for the management of resistant hypertension. *Hypertension*. 1988 Mar;11(3 Pt 2):II101-5.
18. Alper AB, Jr., Calhoun DA. Contemporary management of refractory hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 1999 Oct;1(5):402-7.
19. Vidt DG. Pathogenesis and treatment of resistant hypertension. *Minerva Med*. 2003 Aug;94(4):201-14.
20. Tykarski A. Resistant hypertension. *Blood Press*. 2005 Dec 1;14 Suppl 2:42-5.
21. Zuschke CA, Pettyjohn FS. Pseudohypertension. *South Med J*. 1995 Dec;88(12):1185-90.
22. Messerli FH, Ventura HO, Amodeo C. Osler's maneuver and pseudohypertension. *N Engl J Med*. 1985 Jun 13;312(24):1548-51.
23. Zweifler AJ, Shahab ST. Pseudohypertension: a new assessment. *J Hypertens*. 1993 Jan;11(1):1-6.
24. Ernst ME, Bergus GR. Noninvasive 24-hour ambulatory blood pressure monitoring: overview of technology and clinical applications. *Pharmacotherapy*. 2002 May;22(5):597-612.
25. Horwitz RI, Horwitz SM. Adherence to treatment and health outcomes. *Arch Intern Med*. 1993 Aug 23;153(16):1863-8.
26. Yiannakopoulou E, Papadopulos JS, Cokkinos DV, Mountokalakis TD. Adherence to antihypertensive treatment: a critical factor for blood pressure control. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2005 Jun;12(3):243-9.
27. Caro JJ, Speckman JL, Salas M, Raggio G, Jackson JD. Effect of initial drug choice on persistence with antihypertensive therapy: the importance of actual practice data. *CMAJ*. 1999 Jan 12;160(1):41-6.

28. Mazzaglia G, Mantovani LG, Sturkenboom MC, Filippi A, Trifiro G, Cricelli C, et al. Patterns of persistence with antihypertensive medications in newly diagnosed hypertensive patients in Italy: a retrospective cohort study in primary care. *J Hypertens*. 2005 Nov;23(11):2093-100.
29. Van Wijk BL, Klungel OH, Heerdink ER, de Boer A. Rate and determinants of 10-year persistence with antihypertensive drugs. *J Hypertens*. 2005 Nov;23(11):2101-7.
30. Bane C, Hughes CM, McElnay JC. The impact of depressive symptoms and psychosocial factors on medication adherence in cardiovascular disease. *Patient Educ Couns*. 2006 Feb;60(2):187-93.
31. Gavras HP. Issues in hypertension: drug tolerability and special populations. *Am J Hypertens*. 2001 Jul;14(7 Pt 2):231S-6S.
32. Yakovlevitch M, Black HR. Resistant hypertension in a tertiary care clinic. *Arch Intern Med*. 1991 Sep;151(9):1786-92.
33. Pope JE, Anderson JJ, Felson DT. A meta-analysis of the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on blood pressure. *Arch Intern Med*. 1993 Feb 22;153(4):477-84.
34. Dong W, Colhoun HM, Poulter NR. Blood pressure in women using oral contraceptives: results from the Health Survey for England 1994. *J Hypertens*. 1997 Oct;15(10):1063-8.
35. Lubianca JN, Faccin CS, Fuchs FD. Oral contraceptives: a risk factor for uncontrolled blood pressure among hypertensive women. *Contraception*. 2003 Jan;67(1):19-24.
36. Brecklin CS, Gopaniuk-Folga A, Kravetz T, Sabah S, Singh A, Arruda JA, et al. Prevalence of hypertension in chronic cocaine users. *Am J Hypertens*. 1998 Nov;11(11 Pt 1):1279-83.

37. Lange RA, Cigarroa RG, Flores ED, McBride W, Kim AS, Wells PJ, et al. Potentiation of cocaine-induced coronary vasoconstriction by beta-adrenergic blockade. *Ann Intern Med.* 1990 Jun 15;112(12):897-903.
38. Bravo EL. Phenylpropanolamine and other over-the-counter vasoactive compounds. *Hypertension.* 1988 Mar;11(3 Pt 2):117-10.
39. Esler MD, Lambert GW, Ferrier C, Kaye DM, Wallin BG, Kalff V, et al. Central nervous system noradrenergic control of sympathetic outflow in normotensive and hypertensive humans. *Clin Exp Hypertens.* 1995 Jan-Feb;17(1-2):409-23.
40. Taler SJ, Textor SC, Canzanello VJ, Schwartz L. Cyclosporin-induced hypertension: incidence, pathogenesis and management. *Drug Saf.* 1999 May;20(5):437-49.
41. Cushman WC. Alcohol consumption and hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2001 May-Jun;3(3):166-70.
42. Thadhani R, Camargo CA, Jr., Stampfer MJ, Curhan GC, Willett WC, Rimm EB. Prospective study of moderate alcohol consumption and risk of hypertension in young women. *Arch Intern Med.* 2002 Mar 11;162(5):569-74.
43. Benowitz NL, Jacob P, 3rd. Daily intake of nicotine during cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther.* 1984 Apr;35(4):499-504.
44. Bang LE, Buttenschon L, Kristensen KS, Svendsen TL. Do we undertreat hypertensive smokers? A comparison between smoking and non-smoking hypertensives. *Blood Press Monit.* 2000 Oct-Dec;5(5-6):271-4.
45. Moreno H, Jr., Chalon S, Urae A, Tangphao O, Abiose AK, Hoffman BB, et al. Endothelial dysfunction in human hand veins is rapidly reversible after smoking cessation. *Am J Physiol.* 1998 Sep;275(3 Pt 2):H1040-5.
46. Sabha M, Tanus-Santos JE, Toledo JC, Cittadino M, Rocha JC, Moreno H, Jr. Transdermal nicotine mimics the smoking-induced endothelial dysfunction. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Aug;68(2):167-74.

47. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics*. 2001 Nov;11(8):719-25.
48. Yugar-Toledo JC, Tanus-Santos JE, Sabha M, Sousa MG, Cittadino M, Tacito LH, et al. Uncontrolled hypertension, uncompensated type II diabetes, and smoking have different patterns of vascular dysfunction. *Chest*. 2004 Mar;125(3):823-30.
49. Benowitz NL, Hansson A, Jacob P, 3rd. Cardiovascular effects of nasal and transdermal nicotine and cigarette smoking. *Hypertension*. 2002 Jun;39(6):1107-12.
50. Halimi JM, Giraudeau B, Vol S, Caces E, Nivet H, Tichet J. The risk of hypertension in men: direct and indirect effects of chronic smoking. *J Hypertens*. 2002 Feb;20(2):187-93.
51. Yugar-Toledo JC, Ferreira-Melo SE, Sabha M, Nogueira EA, Coelho OR, Consolin Colombo FM, et al. Blood pressure circadian rhythm and endothelial function in heavy smokers: acute effects of transdermal nicotine. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2005 Dec;7(12):721-8.
52. Materson BJ, Reda D, Freis ED, Henderson WG. Cigarette smoking interferes with treatment of hypertension. *Arch Intern Med*. 1988 Oct;148(10):2116-9.
53. Hall JE. Mechanisms of abnormal renal sodium handling in obesity hypertension. *Am J Hypertens*. 1997 May;10(5 Pt 2):49S-55S.
54. Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am J Hypertens*. 2001 Jun;14(6 Pt 2):103S-15S.
55. Rocchini AP. Obesity hypertension. *Am J Hypertens*. 2002 Feb; 15(2 Pt 2):50S-2S.

56. Hall JE, Summers RL, Brands MW, Keen H, Alonso-Galicia M. Resistance to metabolic actions of insulin and its role in hypertension. *Am J Hypertens*. 1994 Aug;7(8):772-88.
57. Silverberg DS, Oksenberg A, Iaina A. Sleep related breathing disorders are common contributing factors to the production of essential hypertension but are neglected, underdiagnosed, and undertreated. *Am J Hypertens*. 1997 Dec;10(12 Pt 1):1319-25.
58. Laragh J. Laragh's lessons in pathophysiology and clinical pearls for treating hypertension. Lesson XXIV: on the major roles of the renin system in the pathogenesis of hypertension and of its sequelae, heart attack, heart failure, kidney failure, and stroke: replies to commonly asked questions. *Am J Hypertens*. 2001 Aug;14(8 Pt 1):733-42.
59. Akpunonu BE, Mulrow PJ, Hoffman EA. Secondary hypertension: evaluation and treatment. *Dis Mon*. 1996 Oct;42(10):609-722.
60. Kloner RA, Textor SC, Tavel ME. Renovascular hypertension: problems in evaluation and management. *Chest*. 2002 Mar;121(3):964-8.
61. Stowasser M, Gordon RD, Rutherford JC, Nikwan NZ, Daunt N, Slater GJ. Diagnosis and management of primary aldosteronism. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2001 Sep;2(3):156-69.
62. Rayner BL. Screening and diagnosis of primary aldosteronism. *Cardiovasc J S Afr*. 2002 Jul-Aug;13(4):166-70.
63. Young WF, Jr. Primary aldosteronism: management issues. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Sep;970:61-76.
64. Park S, Kim JB, Shim CY, Ko YG, Choi D, Jang Y, et al. The influence of serum aldosterone and the aldosterone-renin ratio on pulse wave velocity in hypertensive patients. *J Hypertens*. 2007 Jun;25(6):1279-83.

65. Holaj R, Zelinka T, Wichterle D, Petrak O, Strauch B, Widimsky J, Jr. Increased intima-media thickness of the common carotid artery in primary aldosteronism in comparison with essential hypertension. *J Hypertens*. 2007 Jul;25(7):1451-7.
66. Cittadino M, Goncalves de Sousa M, Ugar-Toledo JC, Rocha JC, Tanus-Santos JE, Moreno H, Jr. Biochemical endothelial markers and cardiovascular remodeling in refractory arterial hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2003 Jan;25(1):25-33.
67. Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, Safar M. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. *Circulation*. 2002 Nov 26;106(22):2848-53.
68. Endemann DH, Touyz RM, Iglarz M, Savoia C, Schiffrin EL. Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2004 Jun;43(6):1252-7.
69. Schiffrin EL. Effects of aldosterone on the vasculature. *Hypertension*. 2006 Mar;47(3):312-8.
70. Matsubara BB, Matsubara, L. S. Mecanismos de Hipertrofia e Fibrose na Hipertensão Arterial Sistêmica. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*. 2003;13(1):92-103.
71. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006 Nov;27(21):2588-605.
72. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2;341(10):709-17.

73. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2003 Apr 3;348(14):1309-21.
74. Asmar R. Effect of antihypertensive agents on arterial stiffness as evaluated by pulse wave velocity: clinical implications. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2001;1(5):387-97.
75. Asmar R, Topouchian J, Pannier B, Benetos A, Safar M. Pulse wave velocity as endpoint in large-scale intervention trial. The Complior study. Scientific, Quality Control, Coordination and Investigation Committees of the Complior Study. *J Hypertens.* 2001 Apr;19(4):813-8.
76. Jerrard-Dunne P, Mahmud A, Feely J. Ambulatory arterial stiffness index, pulse wave velocity and augmentation index--interchangeable or mutually exclusive measures? *J Hypertens.* 2008 Mar;26(3):529-34.
77. Zureik M, Ducimetiere P, Touboul PJ, Courbon D, Bonithon-Kopp C, Berr C, et al. Common carotid intima-media thickness predicts occurrence of carotid atherosclerotic plaques: longitudinal results from the Aging Vascular Study (EVA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jun;20(6):1622-9.
78. Zhu H, Sagnella GA, Dong Y, Miller MA, Onipinla A, Markandu ND, et al. Contrasting associations between aldosterone synthase gene polymorphisms and essential hypertension in blacks and in whites. *J Hypertens.* 2003 Jan;21(1):87-95.
79. White PC, Slutsker L. Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res.* 1995 Feb-May;21(1-2):437-42.
80. Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE. Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol.* 2002 Apr;28(2):125-35.

81. Kumar NN, Benjafield AV, Lin RC, Wang WY, Stowasser M, Morris BJ. Haplotype analysis of aldosterone synthase gene (CYP11B2) polymorphisms shows association with essential hypertension. *J Hypertens.* 2003 Jul;21(7):1331-7.
82. Davies E, Holloway CD, Ingram MC, Inglis GC, Friel EC, Morrison C, et al. Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension.* 1999 Feb;33(2):703-7.
83. Freel EM, Ingram M, Friel EC, Fraser R, Brown M, Samani NJ, et al. Phenotypic consequences of variation across the aldosterone synthase and 11-beta hydroxylase locus in a hypertensive cohort: data from the MRC BRIGHT Study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007 Dec;67(6):832-8.
84. Hilgers KF, Schmidt BM. Gene variants of aldosterone synthase and hypertension. *J Hypertens.* 2005 Nov;23(11):1957-9.
85. Freitas SR, Cabello PH, Moura-Neto RS, Dolinsky LC, Lima AB, Barros M, et al. Analysis of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms in resistant hypertension. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Mar;40(3):309-16.
86. Chai W, Hoedemaekers Y, van Schaik RH, van Fessem M, Garrelds IM, Saris JJ, et al. Cardiac aldosterone in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006 Dec;7(4):225-30.
87. Biolo A, Chao T, Duhaney TA, Kotlyar E, Allensworth-Davies D, Loscalzo J, et al. Usefulness of the aldosterone synthase gene polymorphism C-344-T to predict cardiac remodeling in African-Americans versus non-African-Americans with chronic systolic heart failure. *Am J Cardiol.* 2007 Jul 15;100(2):285-90.
88. Iwai N, Kajimoto K, Tomoike H, Takashima N. Polymorphism of CYP11B2 determines salt sensitivity in Japanese. *Hypertension.* 2007 Apr;49(4):825-31.

89. Jiang X, Sheng HH, Lin G, Li J, Lu XZ, Cheng YL, et al. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms on blood pressure response to antihypertensive treatment. *Chin Med J (Engl)*. 2007 May 5;120(9):782-6.
90. Tiret L, Mallet C, Poirier O, Nicaud V, Millaire A, Bouhour JB, et al. Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy: the CARDIGENE study. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Jan;35(1):29-35.
91. Rossi E, Regolisti G, Perazzoli F, Negro A, Davoli S, Nicoli D, et al. -344C/T polymorphism of CYP11B2 gene in Italian patients with idiopathic low renin hypertension. *Am J Hypertens*. 2001 Sep;14(9 Pt 1):934-41.
92. Brand E, Schorr U, Ringel J, Beige J, Distler A, Sharma AM. Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism in Caucasians from the Berlin Salt-Sensitivity Trial (BeSST). *J Hypertens*. 1999 Nov;17(11):1563-7.
93. Tsujita Y, Iwai N, Katsuya T, Higaki J, Ogihara T, Tamaki S, et al. Lack of association between genetic polymorphism of CYP11B2 and hypertension in Japanese: the Suita Study. *Hypertens Res*. 2001 Mar;24(2):105-9.
94. Freel EM, Ingram M, Wallace AM, White A, Fraser R, Davies E, et al. Effect of variation in CYP11B1 and CYP11B2 on corticosteroid phenotype and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in hypertensive and normotensive subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 May;68(5):700-6.
95. Ferguson LR, De Flora S. Multiple drug resistance, antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat Res*. 2005 Dec 11;591(1-2):24-33.
96. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Aug;25(8):423-9.

97. Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, et al. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem*. 1992 Dec 5;267(34):24248-52.
98. Uhr M, Holsboer F, Muller MB. Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both mdr1a and mdr1b P-glycoproteins. *J Neuroendocrinol*. 2002 Sep;14(9):753-9.
99. Bello-Reuss E, Ernest S, Holland OB, Hellmich MR. Role of multidrug resistance P-glycoprotein in the secretion of aldosterone by human adrenal NCI-H295 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Jun;278(6):C1256-65.
100. Parker RB, Yates CR, Laizure SC, Weber KT. P-glycoprotein modulates aldosterone plasma disposition and tissue uptake. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006 Jan;47(1):55-9.
101. Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:285-307.
102. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3473-8.
103. Larsen UL, Hyldahl Olesen L, Guldborg Nyvold C, Eriksen J, Jakobsen P, Ostergaard M, et al. Human intestinal P-glycoprotein activity estimated by the model substrate digoxin. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67(2):123-34.
104. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, et al. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet*. 2001 Aug 4;358(9279):383-4.

105. Furuno T, Landi MT, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I, Nappi G, et al. Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*. 2002 Oct;12(7):529-34.
106. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*. 2001 Apr;11(3):217-21.
107. Horinouchi M, Sakaeda T, Nakamura T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N, et al. Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. *Pharm Res*. 2002 Oct;19(10):1581-5.
108. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Jan;75(1):13-33.
109. Pauli-Magnus C, Kroetz DL. Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1). *Pharm Res*. 2004 Jun;21(6):904-13.
110. Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett*. 2006 Mar 8;234(1):4-33.
111. [V Brazilian Guidelines in Arterial Hypertension.]. *Arq Bras Cardiol*. 2007 Sep;89(3):e24-79.
112. Guimaraes JI, Gomes MA, Mion D, Jr., Nobre F, Mendonca MA, Cruz LL, et al. [Standardization of equipments and techniques for exams of ambulatory blood pressure mapping and home blood pressure monitoring]. *Arq Bras Cardiol*. 2003 Feb;80(2):225-33.

113. Taylor DW, Sackett DL, Haynes RB, Johnson AL, Gibson ES, Roberts RS. Compliance with antihypertensive drug therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1978 Mar 30;304:390-403.
114. Rand CS. Measuring adherence with therapy for chronic diseases: implications for the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 1993 Sep 30;72(10):68D-74D.
115. Matsui D, Hermann C, Klein J, Berkovitch M, Olivieri N, Koren G. Critical comparison of novel and existing methods of compliance assessment during a clinical trial of an oral iron chelator. *J Clin Pharmacol.* 1994 Sep;34(9):944-9.
116. Redberg RF, Vogel RA, Criqui MH, Herrington DM, Lima JA, Roman MJ. 34th Bethesda Conference: Task force #3--What is the spectrum of current and emerging techniques for the noninvasive measurement of atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol.* 2003 Jun 4;41(11):1886-98.
117. Lonn E. Modifying the natural history of atherosclerosis: the SECURE trial. *Int J Clin Pract Suppl.* 2001 Jan(117):13-8.
118. Simon A, Gariépy J, Chironi G, Megnien JL, Levenson J. Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. *J Hypertens.* 2002 Feb;20(2):159-69.
119. Lim TK, Lim E, Dwivedi G, Kooner J, Senior R. Normal value of carotid intima-media thickness--a surrogate marker of atherosclerosis: quantitative assessment by B-mode carotid ultrasound. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008 Feb;21(2):112-6.

8- ANEXOS

Parecer do comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
fax (0_19) 3788-8925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 22/01/02
(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 315/2001

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO ENDOTÉLIO E CORRELAÇÃO COM FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA GÊNESE DA HIPERTENSÃO RESISTENTE”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Heitor Moreno Júnior

INSTITUIÇÃO: Departamento de Farmacologia/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/11/2001

II - OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo identificar marcadores genéticos e funcionais do endotélio associados à hipertensão arterial resistente, visando esclarecer mecanismos básicos de controle de pressão arterial, incluindo a identificação de predisposição individual à hipertensão arterial resistente.

III - SUMÁRIO

Estudo de genética molecular e avaliação funcional do endotélio vascular. Serão avaliados 150 indivíduos, sendo 75 pacientes portadores de hipertensão arterial resistente e os demais 75 indivíduos do grupo controle, que não apresentem doença do tipo hipertensão arterial, provenientes do Ambulatório de Hipertensão Resistente do HC/UNICAMP. Os sujeitos da pesquisa sofrerão duas coletas de sangue venosos de 20ml cada. A duração da pesquisa será de 24 meses.

Será feita análise de ligação com marcadores genéticos para tentar estabelecer regiões de ligação com o fenótipo hipertensão arterial resistente. Os genes estudados serão amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR – Polimerase Chain Reaction), visando por meio de análise conformacional da cadeia simples do DNA, a detecção de mutações ou alterações específicas no referido gene, seguido de sequenciamento dos fragmentos amplificados com alterações previamente selecionadas.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O presente projeto encontra-se bem descrito como deverá ser executado, não demonstrando apresentar riscos para o paciente.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é elucidativo e claro para os participantes.

Os autores fizeram as modificações sugeridas no parecer anterior. Sugerimos aprovação por este Comitê.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

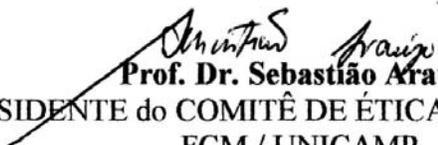
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de janeiro de 2002.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



PARECER Nº 295/2002

Registro CONEP = 3648 (Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Protocolo CEP =315/2001

Processo nº 25000.010515/2002-19

Projeto de Pesquisa: "Avaliação funcional do endotélio e correlação com fatores genéticos envolvidos na gênese da hipertensão arterial resistente".

Pesquisador Responsável: Dr. Heitor Moreno Júnior

Instituição: FCM / UNICAMP

Área Temática Especial : Genética humana

Trata-se de pesquisa que objetiva identificar marcadores genéticos e funcionais do endotélio associados à hipertensão arterial resistente, visando esclarecer mecanismos básicos de controle de pressão arterial, incluindo a identificação de predisposição individual à hipertensão arterial resistente.

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:

a) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada ;

b) as informações enviadas atendem de modo geral aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96 , sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com as seguintes recomendações:

1 – Diante dos resultados, devem ser consideradas as conseqüências para os pacientes e grupo controle, especialmente quanto a aconselhamento genético e garantia de confidencialidade.

2 – Eventual uso do material armazenado para novos estudos, dependerá da aprovação do CEP e da CONEP (quando for o caso).

3 – Confirmar o nº de sujeitos da pesquisa. O informado no campo 9 da Folha de Rosto, difere do que consta no protocolo.

Situação : Projeto aprovado com recomendações.

Brasília, 21 de fevereiro de 2002.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS

Termo de Consentimento Esclarecido

CONSENTIMENTO INFORMADO

Você está convidado a participar de um estudo sobre envolvimento dos fatores genéticos na hipertensão arterial resistente. Nós estudaremos a influência dos fatores genéticos envolvidos na hipertensão arterial resistente através de pesquisa genética e de biologia molecular em amostras de sangue venoso coletadas para tal finalidade. Se você decidir participar no estudo, o Prof. Dr. Heitor Moreno Jr. ou Dr. Juan Carlos Yugar Toledo, ou outros médicos da equipe descreverão detalhadamente o estudo a você.

Se você é mulher em idade reprodutiva, tem que estar usando método anticoncepcional (pílula ou DIU) por pelo menos 3 meses antes do estudo ou ter sido submetida à cirurgia de esterilização. Isto é, para que se tenha certeza de que você não está grávida e não ficará grávida durante todo o estudo. Você deve também estar ciente de que mesmo o mais efetivo dos métodos anticoncepcionais tem um pequeno risco de permitir a gravidez.

Enquanto participando deste estudo, você não deve tomar parte em outro projeto de pesquisa sem a aprovação dos pesquisadores envolvidos nos estudos.

Amostras de sangue seriadas serão coletadas durante o estudo. O volume total de sangue a ser coletado durante o período total de estudo (6 meses) não será superior a 400 ml.

Este estudo poderá resultar em uma melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos na gênese da hipertensão arterial resistente.

NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTE ESTUDO.

Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade, entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e da identidade dos voluntários envolvidos nela.

Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Dr. Juan Carlos Yugar Toledo (fone: 017-3227-3057).

Todos os tipos de tratamento ou diagnóstico médico, experimentais ou não, envolvem algum risco de prejuízo à saúde. O estudo será realizado em ambiente ambulatorial, portanto com os recursos disponíveis para atendimento de possíveis emergências. Apesar de todas as precauções, complicações podem ocorrer decorrentes de sua participação no estudo. Nesse caso, você será encaminhado para assistência médica. A duração prevista do estudo será de 18 meses.

A SUA ASSINATURA, EM CADA PÁGINA DESTE DOCUMENTO, SIGNIFICA QUE: VOCÊ LEU E ENTENDEU AS INFORMAÇÕES ACIMA; VOCÊ DISCUTIU O ESTUDO COM O INVESTIGADOR PRINCIPAL E/OU SUA EQUIPE; VOCÊ DECIDIU PARTICIPAR DO ESTUDO COM BASE NAS INFORMAÇÕES FORNECIDAS; UMA CÓPIA DESTE CONSENTIMENTO FOI DADA A VOCÊ.

Assinatura do voluntário

Data

Assinatura do investigador ou testemunha