



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

NATÁLIA RUGGERI BARBARO

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E DAS CONCENTRAÇÕES  
PLASMÁTICAS DE METALOPROTEINASE 9 E SEU INIBIDOR TIMP-1 NA  
HIPERTENSÃO RESISTENTE

*ASSESSMENT OF MATRIX METALLOPROTEINASE 9 GENETIC  
POLYMORPHISMS, CIRCULATING LEVELS AND ITS INHIBITOR TIMP-1 IN  
RESISTANT HYPERTENSION*

CAMPINAS

2016

NATÁLIA RUGGERI BARBARO

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E DAS CONCENTRAÇÕES  
PLASMÁTICAS DE METALOPROTEINASE 9 E SEU INIBIDOR TIMP-1 NA  
HIPERTENSÃO RESISTENTE

*ASSESSMENT OF MATRIX METALLOPROTEINASE 9 GENETIC  
POLYMORPHISMS, CIRCULATING LEVELS AND ITS INHIBITOR TIMP-1 IN  
RESISTANT HYPERTENSION*

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia

*Doctorate thesis presented to the Faculty of Medical Sciences, State  
University of Campinas, as part of the requirements for obtaining the  
title of PhD degree in Pharmacology.*

ORIENTADOR: PROF.<sup>a</sup> DR. HEITOR MORENO JUNIOR  
COORIENTADORA: PROF.<sup>a</sup> DR<sup>a</sup>. VANESSA FONTANA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA  
ALUNA NATÁLIA RUGGERI BARBARO,  
E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. HEITOR MORENO JUNIOR.

CAMPINAS

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2012/23410-7

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B232a Barbaro, Natália Ruggeri, 1988-  
Avaliação de polimorfismos genéticos e das concentrações plasmáticas de metaloproteínase 9 e seu inibidor TIMP-1 na hipertensão resistente / Natália Ruggeri Barbaro. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Heitor Moreno Junior.  
Coorientador: Vanessa Fontana.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Metaloproteínase 9 da matriz. 2. Inibidor tecidual de metaloproteínase-1. 3. Hipertensão. 4. Hipertrofia ventricular esquerda. 5. Rigidez vascular. I. Moreno Junior, Heitor, 1958-. II. Fontana, Vanessa. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Assessment of matrix metalloproteinase 9 genetic polymorphisms, circulating levels and its inhibitor TIMP-1 in resistant hypertension

**Palavras-chave em inglês:**

Matrix metalloproteinase 9  
Tissue inhibitor of metalloproteinase-1  
Hypertension  
Hypertrophy, Left ventricular  
Vascular stiffness

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Doutora em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Gabriel Forato Anhô  
Isclia Teresinha Lopes Cendes  
Ricardo Lacchini  
Michele Mazzaron de Castro  
Fabiola Taufic Mônica Iglesias

**Data de defesa:** 23-06-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

*NATÁLIA RUGGERI BARBARO*

---

**ORIENTADOR: PROF(A). DR(A). HEITOR MORENO JUNIOR**

**COORIENTADOR: PROF(A). DR(A). VANESSA FONTANA**

---

## **MEMBROS:**

- 1. PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ**
- 2. PROF. DR. FABÍOLA TAUFIC MÓNICA IGLESIAS**
- 3. PROF. DR. ISCIA TERESINHA LOPES CENDES**
- 4. PROF. DR. RICARDO LACCHINI**
- 5. PROF. DR. MICHELE MAZZARON DE CASTRO**

---

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

**Data: 23 de junho de 2016**

A Deus.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Heitor Moreno Jr**, obrigada pelas oportunidades, por acreditar no meu potencial e por compartilhar sua sabedoria.

À minha coorientadora, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Fontana**, por todos ensinamentos acadêmicos e pessoais, apoio, pelo exemplo de conduta profissional e por ter sido essencial durante a realização do meu doutorado.

Aos meus pais, **Karla e José**, e minha irmã, **Daniela**, faltam palavras para expressar este agradecimento. Obrigada pelo apoio e amor, pelos conselhos e incentivos, por me ajudarem sempre a trilhar meus caminhos.

À toda minha família, em especial à minha avó **Gilda** e minhas tias **Maria da Glória e Elizabeth**, pelos incentivos e apoio em minha educação.

Ao meu namorado, **Juan Pablo**, por todo seu entusiasmo e suporte.

À companheira **Andrea Sabbatini**, pelo trabalho em equipe para recrutarmos nossos voluntários e ao **Prof. Dr. Claudio Pinho**, por nos ceder espaço em sua clínica; a ajuda de vocês foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, por toda cooperação, momentos de descontração e pela troca de experiências.

A todos os meus demais amigos, em especial minhas amigas do coração, da faculdade (**Jacqueline, Tatiana, Alina e Letícia**), por compartilharmos o amor à profissão; do condomínio, (**Ana Beatriz, Daniele, Juliana e Mariana**), e do colegial, (**Aline, Marina, Mayara, e Verônica**) que foram um ponto de equilíbrio essencial durante esse processo.

Aos voluntários que participaram deste projeto.

À **FAPESP** pelo auxílio financeiro (número do processo da bolsa 2012/23410-7) e pelo apoio científico.

*“A solução dos problemas apenas restaura a normalidade.  
Aproveitar oportunidades significa explorar novos caminhos.”*

Peter Drucker

A hipertensão arterial resistente (HAR) é definida pela presença de pressão arterial (PA) acima da meta pressórica com o uso de três classes de anti-hipertensivos, ou ainda os pacientes que atingem controle da PA utilizando quatro ou mais fármacos. A morbidade e mortalidade associadas à hipertensão são atribuídas às lesões de órgãos-alvo, sendo que a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e rigidez arterial são fatores de risco independentes para os desfechos cardiovasculares. A participação das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), dentre elas, a MMP-9, no remodelamento que leva à HVE e à rigidez arterial são bem descritas em modelos animais, porém na hipertensão resistente não há estudos na literatura. Os polimorfismos do gene da MMP-9, -1562C>T (rs3918242) e um segundo, chamado de R279Q (rs17576) estão associados ao aumento nos níveis de MMP-9 e eventos cardiovasculares. Também, foi demonstrada a influência do polimorfismo R279Q sobre a rigidez arterial em indivíduos saudáveis. Por fim, o SNP não sinônimo Q668R (rs17577) foi associado com doença coronariana em pacientes hipertensos tratados com Anlodipino. Até o momento, nenhum polimorfismo no gene da MMP-9 foi avaliado na HAR. Portanto o presente trabalho teve como objetivos: (1) Determinar os níveis circulantes de MMP-9, do inibidor TIMP-1 e da razão MMP-9/TIMP-1 (atividade global da MMP-9) nos grupos de hipertensos resistentes (HAR) (n=124) e não resistentes (HAS) (n=136); (2) Avaliar a associação entre os níveis da MMP-9 e TIMP-1 com o grau de rigidez arterial e HVE nos grupos de hipertensos; (3) Avaliar as frequências dos alelos, genótipos e haplótipos para os polimorfismos da MMP-9 (rs3918242, rs17576 e rs17577) nos HAS e HAR e (4) Avaliar a relação dos polimorfismos com as concentrações de MMP-9 e com HVE e rigidez arterial. Os níveis plasmáticos de MMP-9 e TIMP-1 foram avaliados por ELISA. O grupo de HAR apresentou menor concentração de MMP-9, menor razão MMP-9/TIMP-1 e maiores valores de TIMP-1 comparados aos HAS. Em seguida, avaliamos a associação desses biomarcadores com a rigidez arterial, avaliada através de velocidade de onda de pulso (VOP), e com a HVE, avaliada através do índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE) por ecocardiograma. A MMP-9 e a relação MMP-9/TIMP-1 foram positivamente correlacionadas com o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) no grupo HAR. Já no grupo HAS, as mesmas correlações foram negativas. O TIMP-1 foi negativamente correlacionado com IMVE no grupo HAR e positivamente associado à IMVE no grupo HAS. Não foi encontrada correlação entre IMVE e MMP-9, nem

correlações entre VOP com MMP-9 e TIMP-1 em ambos os grupos. Por fim, determinaram-se as frequências genóticas dos polimorfismos -1562C>T por PCR seguida de eletroforese, e dos polimorfismos R279Q e Q668R, por PCR em tempo real utilizando sondas Taqman. As frequências haplotípicas foram estimadas pelo programa PHASE. Não houve diferenças nas frequências genóticas, alélicas e haplotípicas entre os grupos. Nós avaliamos ainda a associação dos diferentes genótipos com as concentrações de MMP-9, rigidez arterial e prevalência de HVE, mas nenhuma associação foi encontrada. Nossos resultados sugerem que o equilíbrio entre MMP-9 e TIMP-1 varia de acordo com a gravidade da hipertensão e estão associados com HVE. Além disso, nossos dados demonstraram que os 3 polimorfismos genéticos da MMP-9 não estão associados com o fenótipo de HAR e não afetam os níveis plasmáticos de MMP-9 nos pacientes hipertensos estudados.

Palavras- Chave: Metaloproteinase 9 da matriz, Inibidor Tecidual de Metaloproteinase-1, Hipertensão, Hipertrofia Ventricular Esquerda, Rigidez Vascular, Polimorfismo Genético

Resistant hypertension (RHTN) is defined as BP that remains above goals despite of the concurrent use of 3 antihypertensive agents of different classes at optimal dose amounts. Also, patients whose BP are controlled but require 4 or more medications are considered resistant. Left ventricular hypertrophy (LVH) and arterial stiffness are important predictors of mortality and morbidity and it is related to major cardiovascular events. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc dependent enzymes. MMP-9 participates in cardiovascular remodeling that contributes to LVH and arterial stiffness. These relationships are well described in animal models of hypertension, however in RHTN remains unclear. Genetics polymorphisms in MMP-9 gene including -1562C>T (rs3918242) and R279Q (rs17576) were associated with MMP-9 levels and cardiovascular events. The relationship between R279Q and arterial stiffness was also described in healthy volunteers. Finally, non-synonymous SNP Q668R (rs17577) was related to coronary disease in hypertensive patients treated with Amodipine. To date, no MMP-9 polymorphisms were evaluated in RHTN. Therefore, this study aimed: (1) To evaluate the levels of MMP-9, TIMP-1 and MMP-9/TIMP-1 ratio in RHTN subjects (n=124) and non-RHTN (HTN) (n=136) (2) To evaluate the relationship between MMP-9 and TIMP-1 with arterial stiffness and LVH in both groups (3) To evaluate the frequencies of MMP-9 polymorphisms (rs3918242, rs17576 e rs17577) in HTN vs. RHTN (4) To evaluate the relationship of genetic polymorphisms with MMP-9 levels, LVH and arterial stiffness. Plasma levels of MMP-9 and TIMP-1 were measured by ELISA. RHTN subjects presented decreased levels of MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratio and higher TIMP-1 compared to HTN. We evaluated the association of these biomarkers with arterial stiffness, measured by pulse wave velocity (PWV), and with LVH, defined by left ventricular mass index (LVMI) (by echocardiogram). MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratio were positively correlated with LV diastolic diameter (LVDD) in RHTN group. On the other hand, these biomarkers were inversely related to LVDD in HTN group. TIMP-1 was negatively related to LVMI in RHTN subjects, while positive association was found in HTN group. No relationship was found between LVMI and MMP-9, neither between PWV and MMP-9 nor TIMP-1 in both groups. We assessed genotypic frequency of -1562C>T using PCR followed by electrophoresis. R279Q and Q668R polymorphisms were determined using Real Time PCR with Taqman probes. Haplotype frequencies were estimated by PHASE software. There were no significant differences in the genotypes, alleles or haplotypes distributions

between the RHTN patients and HTN. Moreover, no differences were found in MMP-9 levels, PWV or LVMI according to MMP-9 genotypes. Our data suggest that MMP/TIMP balance varies according to the severity of hypertension and are associated with resistant hypertension and left ventricular hypertrophy. In addition, genetic polymorphisms in MMP-9 are not associated to RHTN phenotype and do not affect MMP-9 levels in the hypertensive patients studied.

Key-words: Matrix Metalloproteinase 9, Tissue Inhibitor 1, Hypertension, Left Ventricular Hypertrophy, Vascular Stiffness, Genetic Polymorphisms

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína quinase serina/treonina
AP-1	Ativador da proteína 1
ARA II	Antagonistas do receptor de angiotensina II
AVC	Acidente vascular cerebral
BCC	Bloqueadores do canal de cálcio
CMLV	Células do músculo liso vascular
DCV	Doenças cardiovasculares
DDVE	Diamêtro diastólico do ventrículo esquerdo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i> / Quinase regulada pela sinalização extracelular
FE	Fração de Ejeção
HAR	Hipertensão Resistente
HAS	Hipertensão Arterial
HVE	Hipertrofia do ventrículo esquerdo
IECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IMVE	Índice de massa do ventrículo esquerdo
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i> / proteína quinase c-jun ativada
LOA	Lesões de órgãos alvo
MAPA	Monitorização ambulatorial da pressão arterial
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> / Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase
MVE	Massa do ventrículo esquerdo
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PPVE	Parede posterior do ventrículo esquerdo

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i>
SIVD	Septo interventricular
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TIMP-1	Inibidores teciduais de metaloproteinases 1
VDF	Volume diastólico final
VSF	Volume sistólico final
VOP	Velocidade de onda de pulso

---

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1 Hipertensão Arterial Resistente</b> .....	12
<b>1.2 Alterações fisiopatológicas na hipertensão e lesões de órgãos-alvo</b> .....	14
<b>1.3 Remodelamento cardiovascular e metaloproteinasas e seus inibidores</b> .....	15
<b>1.4 Estudos de associação genética na hipertensão resistente</b> .....	19
<b>1.5 Polimorfismos genéticos no gene da metaloproteinase 9</b> .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.1 Seleção dos participantes</b> .....	23
<b>3.2 Coletas de sangue e exames bioquímicos</b> .....	24
<b>3.3 Medidas da pressão arterial</b> .....	25
<b>3.4 Avaliação da velocidade de onda de pulso (VOP)</b> .....	25
<b>3.5 Avaliação da hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE)</b> .....	26
<b>3.6 Genotipagens</b> .....	26
<b>4. RESULTADOS</b> .....	29
<b>4.1 Artigo 1: “Alterations in Metalloproteinase 9 and tissue inhibitor 1 levels in resistant hypertension and the relationship with left ventricular hypertrophy”</b> .....	29
<b>4.2 Artigo 2: “Genetic polymorphisms of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in resistant hypertension ”</b> .....	46
<b>4.3 Resultados adicionais</b> .....	66
<b>5. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	72
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	80
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	81
<b>8. ANEXOS</b> .....	91
<b>8.1 ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)</b> .....	91
<b>8.2 ANEXO B: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)</b> .....	94

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Hipertensão Arterial Resistente

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). As diretrizes brasileira, européia e americana de hipertensão definem como meta pressórica PA <140/90 mmHg para indivíduos menores de 60 anos (1-3), já as novas diretrizes americanas preconizam o limite de  $\leq 150/90$  mm Hg para indivíduos com mais de 60. Embora haja divergência nas metas pressóricas, inúmeros estudos demonstraram correlação entre os níveis da PA de consultório e a incidência de eventos cardiovasculares como acidente vascular cerebral (AVC), infarto do miocárdio, morte súbita, insuficiência cardíaca, doença arterial periférica e doença renal terminal (3-5), sendo que a mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (4). E recente estudo clínico chamado SPRINT demonstrou que o tratamento intensivo da hipertensão, diminuindo a meta da pressão arterial sistólica (PAS) para 120mmHg reduziu os eventos cardiovasculares em hipertensos não diabéticos (6). Além disso, o tratamento da hipertensão é associado com redução da incidência de infarto do miocárdio (20-25%), AVC (35-40%) e insuficiência cardíaca (>50%) (7). A prevalência da hipertensão na população brasileira é de cerca de 30%, sendo que em torno de 13% das mortes por doenças do aparelho circulatório no Brasil são causadas pela HAS (2).

Apesar de inúmeros avanços das últimas décadas em termos de desenvolvimento de drogas anti-hipertensivas, os mecanismos fisiopatológicos da hipertensão não são completamente esclarecidos e o controle pressórico continua subótimo na população (8). Assim, a hipertensão ainda trata-se de uma doença de alta prevalência e constitui um importante fator de risco cardiovascular com taxas de controle baixas onde cerca de 50% dos hipertensos não atingem as metas pressóricas de <140/90 mmHg (9). Neste contexto, a hipertensão arterial resistente (HAR) é definida pela presença de PA acima da meta pressórica com o uso de três classes de anti-hipertensivos, em combinação racional de doses máximas, incluindo idealmente um diurético, ou ainda os pacientes que utilizam quatro ou mais fármacos, e obtêm controle da PA (10). Para caracterização destes pacientes é

importante excluir as causas secundárias de hipertensão (hiperaldosteronismo primário, nefropatia crônica avançada, estenose de artéria renal, coarctação de aorta e pseudorresistência). A pseudorresistência inclui a falta de adesão ao tratamento (farmacológico ou não farmacológico), como demonstrado recentemente que dentre pacientes considerados resistentes, cerca de 50% foi considerado não aderente, pois, após administração da medicação assistida tiveram redução da PA(11). Ainda, estudo avaliou as concentrações séricas das drogas administradas por pacientes HAR e conclui que 86% não eram aderentes pois pelo menos uma dentre as medicações administradas não foram detectadas (12). Estudo de nosso laboratório demonstrou por contagem de comprimidos que a taxa de adesão aumentou de 63% para 94% após monitoramento intensivo de adesão e assistência farmacêutica (13, 14). Sobre a adesão não farmacológica, a alta ingestão de sódio pode dificultar o controle da PA sendo que neste grupo de hipertensos a dieta hipossódica se mostrou eficaz na redução da PA(15). Outras causas de pseudorresistência devem ser excluídas como o efeito do jaleco branco e técnica inadequada de aferição da PA (manguitos pequenos para a circunferência do braço). O efeito do jaleco branco pode ser excluído pela monitorização ambulatorial da PA (MAPA) (16).

A prevalência de HAR é estimada entre 4,5- 20% da população de hipertensos (17, 18). Um recente estudo longitudinal brasileiro (ELSA) encontrou uma prevalência de HAR de 11% entre os pacientes hipertensos(19). Nosso grupo e outros observaram diferenças fenotípicas entre os pacientes classificados como resistentes, incluindo grau de obesidade, excesso de aldosterona plasmática, raça negra, idade e maiores prevalências de lesões em órgãos-alvo ou de seus marcadores como rigidez arterial, hipertrofia ventricular esquerda, maior espessura da íntima média e microalbuminúria (19-25). Assim, este grupo de pacientes apresenta alto risco cardiovascular e maiores taxas de eventos cardiovasculares quando comparados a hipertensos não resistentes (26).

Alguns grandes estudos clínicos têm investigado estratégias para o tratamento da hipertensão resistente. O estudo randomizado, cruzado e duplo cego “PATHWAY” teve como objetivo identificar o quarto fármaco ideal para estes pacientes, assim entre bisoprolol, doxazosin, espironolactona e placebo, a espironolactona mostrou-se mais eficaz na redução da PA, indicando que a retenção de sódio é um fator predominante na fisiopatologia da HAR (27). Além disso, a aldosterona está envolvida em alterações na estrutura e função cardíaca em

diversas doenças cardiovasculares clínicas incluindo hipertensão (28, 29) e pacientes HAR possuem elevados níveis plasmáticos de aldosterona comparados com hipertensos de grau leve e moderado e normotensos (20, 30, 31). Outra potencial intervenção é a ablação da artéria renal que inicialmente mostrou-se eficaz em hipertensos resistentes (32, 33), porém em estudo clínico mais recente, o SIMPLICITY- HTN3, que foi um estudo controlado, randomizado e com um grupo controle, que realizou o exame, mas não a ablação (*sham-procedure*) mostrou não haver redução significativa de pressão arterial relacionada à denervação de artérias renais (34). Além disso, o tratamento de hipertensão não inclui somente diminuir a pressão. Estudos clínicos têm demonstrado que anti-hipertensivos com eficácia semelhantes na redução da PA não reduzem os eventos cardiovasculares igualmente. Por exemplo, atenolol, doxazosin e hidroclorotiazida foram inferiores na redução de eventos em comparação ao losartan, clortalidona e anlodipino, respectivamente, nos estudos clínicos LIFE, ALLHAT, e ACCOMPLISH, apesar de similares reduções na PA (35-37). Portanto, mecanismos fisiopatológicos da hipertensão e das lesões de órgãos alvo (LOA) associadas a fim de identificar terapias mais efetivas são emergentes. Ademais, estudos demonstraram que pacientes HAR têm prognóstico desfavorável tanto pelo difícil controle pressórico quanto pela maior prevalência de LOA (23, 26, 38).

### **1.2 Alterações fisiopatológicas na hipertensão e lesões de órgãos-alvo**

A morbidade e mortalidade associadas à hipertensão são atribuídas às lesões de órgãos-alvo, destacando-se o coração e os vasos sanguíneos. Alterações nestes dois importantes órgãos levam aos desfechos cardiovasculares, como acidente vascular encefálico (AVC), infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (39). Essas alterações refletem um processo de adaptação desses órgãos em resposta a sobrecarga volêmica ou pressórica. De maneira simplificada, no coração ocorre aumento de massa muscular para comportar esse volume extra e a ativação de mecanismos neurohormonais para aumentar a contratilidade (40). Dados do *Framingham Heart Study Offspring Cohort* mostraram que a cada 10-g/m<sup>2</sup> de aumento no IMVE foi associado com um aumento de 33% no risco para eventos cardiovasculares (infarto do miocárdio, insuficiência coronariana, insuficiência cardíaca e AVC) (41). A principal e mais comum alteração cardíaca na hipertensão é a hipertrofia ventricular esquerda (HVE), variando de 20%, em hipertensos leves, a 70% em hipertensos mais graves (42). A HVE é um fator de risco independente para

eventos cardiovasculares (43). Na hipertensão resistente, foi encontrada prevalência de 40% em HAR em comparação a 12% no grupo não resistente(22), sendo a razão de prevalência de HVE de 2,08 comparados aos não resistentes em outro estudo (19). Dentre os hipertensos resistentes, aqueles que não atingem as metas pressóricas (não controlados) apresentam índice de massa ventricular esquerda maior que os pacientes controlados (20).

Nos vasos, a alta pressão aumenta o estresse na parede que acelera a degradação de elastina (44) e a degradação de colágeno para aumentar a distensibilidade da artéria e impedir o aumento da PA (45). A elastina ao ser sintetizada novamente não possui as mesmas características elásticas iniciais e, ao longo da resposta crônica a alta PA, ocorre a deposição de colágeno. Ambos processos contribuindo para rigidez do vaso (46). A complacência da parede vascular depende da contribuição do colágeno e elastina, que conferem integridade estrutural e elasticidade ao vaso. Além de mudanças estruturais, alterações em células musculares lisas contribuem para o desenvolvimento da rigidez arterial. O tônus vascular pode ser modificado por deposição de cálcio e pela ação de mediadores parácrinos como Ang II, endotelina, estresse oxidativo e óxido nítrico (47, 48). Na hipertensão, a rigidez arterial pode estar presente mesmo nos estágios iniciais da doença causando a redução da capacidade de amortecer as alterações cíclicas da pressão sanguínea nas paredes das artérias (49), constituindo um importante fator de risco de mortalidade cardiovascular em hipertensos (50). A rigidez arterial também foi preditora de mortalidade cardiovascular e associada com a presença de aterosclerose (51). Além disso, foi demonstrado que a rigidez arterial é maior em pacientes hipertensos resistentes comparados com hipertensos de grau leve a moderado e normotensos (21) e é maior em pacientes HAR não-controlados com relação aos controlados (20).

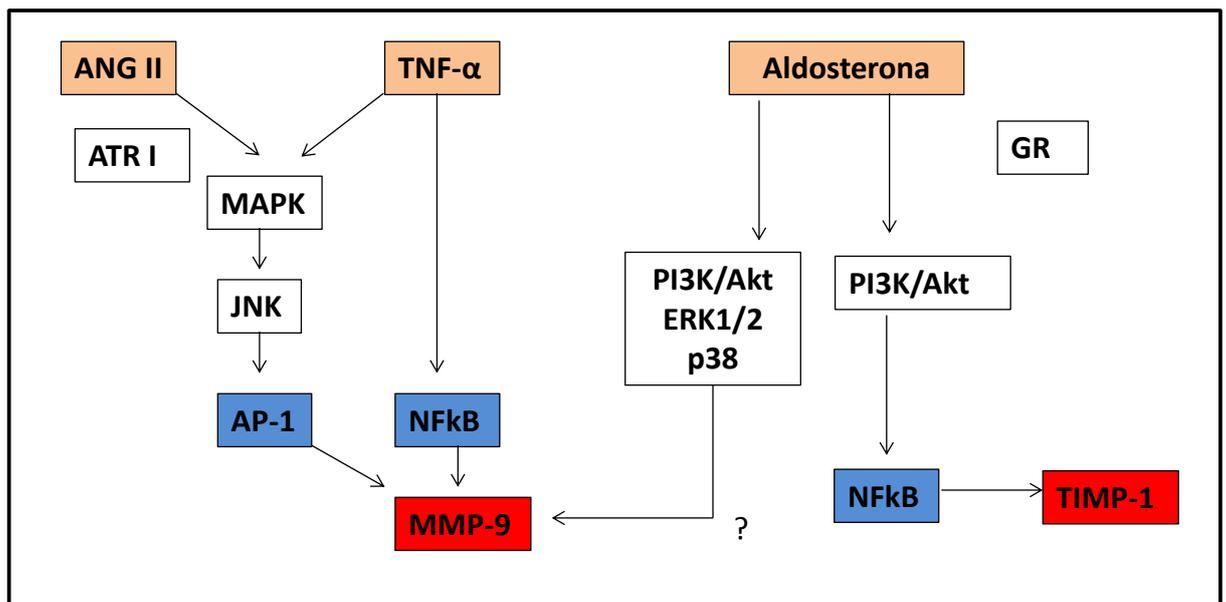
A rigidez arterial pode ser avaliada de maneira não invasiva pela estimativa da VOP, um método simples e reproduzível (52, 53). Estudos epidemiológicos demonstraram que o aumento da VOP, marcador de rigidez arterial, está associado com aumento de risco da morbidade e mortalidade por doença cardiovascular (50, 54, 55).

### **1.3 Remodelamento cardiovascular e metaloproteínas e seus inibidores**

A fisiopatologia da hipertrofia ventricular esquerda e da rigidez arterial tem como base um processo conhecido como remodelamento tecidual. O remodelamento

cardiovascular se caracteriza por alterações estruturais e funcionais nos tecidos cardíacos e vasculares em resposta às alterações mecânicas, hemodinâmicas e neurohumorais que acompanham a hipertensão (56). A hipótese clássica para resposta adaptativa do coração à alta pressão é que ocorre o aumento na largura dos miócitos causando o aumento da espessura da parede cardíaca. Dependendo do estímulo, diferentes vias podem ser ativadas. A angiotensina II (Ang II) é responsável pela ativação de uma dessas vias; quando a Ang II é liberada pelo miocárdio em resposta ao aumento do estresse, ela se liga ao seu receptor que é acoplado à proteína G e a isoforma da proteína quinase C (PKC), assim, é ativado o complexo de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) que pode promover tanto sobrevivência (pela ativação da via ERK (*Extracellular Signal-regulated Kinase*) ou apoptose (pela ativação da via JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), a última está relacionada diretamente a alteração das funções contráteis das células na hipertrofia mal-adaptativa(57). Outras vias envolvidas da hipertrofia ventricular são as que promovem fibrose e são ativadas por aldosterona, pelo fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e pelo excesso de TNF- $\alpha$  (58). A matriz extracelular (MEC) é sintetizada pelos fibroblastos cardíacos e mantém a arquitetura do miocárdio, sendo que a Ang II, a aldosterona e o TGF- $\beta$  podem induzir a síntese de colágeno e fibrose (57). No remodelamento vascular, os grandes vasos (condutância) podem apresentar hipertrofia da parede caracterizada pelo espessamento da camada média sem alteração do diâmetro do lúmen, enquanto nos vasos de menor calibre (resistência) é observada a hipertrofia e diminuição do lúmen. Em ambos os remodelamentos vasculares, ocorre a reorganização da estrutura da MEC, hipertrofia e hiperplasia das células do músculo liso vascular (CMLV) e deposição de proteínas extracelulares (46). Neste processo, o fenótipo contrátil das CMLV é alterado para que estas migrem, proliferem e aumente a produção de componentes da MEC que promovem o enrijecimento e espessamento dos vasos (59). Intimamente vinculadas ao processo de reorganização da matriz extracelular estão as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs). Essas enzimas são endopeptidases dependentes de zinco que degradam diversas proteínas que compõem a matriz dos vasos sanguíneos e do miocárdio, como alguns tipos de colágenos, fibronectina e elastina (60). As MMPs são sintetizadas na forma de zimogênios inativos contendo um pró-domínio autoinibitório que, ao ser removido por proteases, ou deslocados por agentes capazes de interagir com o

grupo tiol da cisteína no centro ativo, promovem a ativação da enzima. Além da regulação pós-traducional, as MMPs são reguladas no nível transcricional. A Ang II potencialmente aumenta a expressão de MMP-9, já que a ativação de seu receptor induz fatores de transcrição que ativam os sites de transcrição AP-1 e NF- $\kappa$ B, que estão presentes na região promotora do gene da MMP-9 (61). Citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , por ativarem vias da MAPK (JNK) têm como evento comum a formação de fatores de transcrição que também ativam esses sítios da MMP-9 (61, 62). O TGF- $\beta$ , considerado uma molécula pro-fibrótica, tem sido relacionado com alterações nos níveis de MMP. O TGF- $\beta$  inibiria o AP-1 e impediria a transcrição de MMPs impedindo a renovação da MEC(61), porém o oposto também já foi observado, onde a diminuição de TGF- $\beta$  concomitantemente com MMPs foi descrita (63). Além disso, a aldosterona aumentou a expressão de MMP-9 em neutrófilos de maneira dose-dependente (64), e recentemente, foi demonstrado que ela induz a expressão do inibidor tecidual de metaloproteinase 1 (TIMP-1) via receptor de glicocorticoide pela ativação da via de sinalização do fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) (65). O esquema da figura 1 representa alguns mediadores de MMP-9 descritos na literatura. A atividade das MMPs é contrabalançada pela interação com inibidores endógenos como os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs; *tissue inhibitors of metalloproteinases*) (66).



**Figura 1: Esquema representando alguns mediadores da MMP-9 e TIMP-1 e suas respectivas vias de sinalização.** ATR I: Receptor de Angiotensina tipo 1; RG: Receptor de Glicocorticóides.

As MMPs do subgrupo das gelatinases (MMP-2 e -9) são as mais estudadas na área cardiovascular. A MMP-9, também conhecida por 92kDa colagenase tipo 4 ou gelatinase B é produzida por várias células do sistema imune incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos, células dendríticas e também por outros tipos celulares como células endoteliais, osteoblastos e fibroblastos (67). Seus principais substratos são colágeno desnaturado (gelatina), elastina, fibronectina e colágeno tipo IV, porém na última década, um amplo repertório de substratos foram descritos como: componentes intracelulares como actina e tubulina, entre outros; alguns autoantígenos descritos em doenças autoimunes (68); e o receptor beta-adrenérgicos dos vasos (69).

As MMPs são inibidas por interação estequiométrica 1:1 com seus inibidores endógenos, sendo que o TIMP-1 tem alta afinidade pela MMP-9 (66). O TIMP-1 é produzido por inúmeros tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais, células dendríticas, CMLV, adipócitos e monócitos. Enquanto a maioria dos trabalhos tem focado na sua função inibitória de MMP, já foi descrito que o TIMP-1 tem efeito anti-apoptótico em linfócitos B (70), está envolvido no crescimento e diferenciação celular de fibroblastos cardíacos (71, 72), e pode inibir a migração de células endoteliais de maneira independente do efeito inibitório das MMPs(73). As concentrações de TIMP-1 estavam aumentadas em biopsias cardíacas humanas de pacientes com estenose aórtica e hipertrofia ventricular esquerda, e foram correlacionadas com o grau de fibrose intersticial (74). Estudo mostrou que camundongos com deficiência para TIMP-1 tiveram uma hipertrofia acentuada após infarto do miocárdio (75). Por fim, os níveis de TIMP-1 foram maiores em pacientes com histórico de infarto do miocárdio e angina e foram associados com maior risco cardiovascular avaliado pelo *Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) score* (76).

No âmbito da hipertensão arterial, diversos trabalhos em modelos animais têm demonstrado o envolvimento das gelatinases no remodelamento cardiovascular que acompanha a hipertensão (77). Animais knockout para MMP-9 apresentam um remodelamento do ventrículo esquerdo atenuado, demonstrando a importância dessa enzima na HVE (78). Níveis aumentados de MMPs foram observados em vasos sanguíneos de diferentes modelos experimentais de hipertensão (79, 80). No modelo L-NAME, a atividade de MMP-2 avaliada por zimografia aumentou nos vasos sendo que o remodelamento vascular foi prevenido com o uso de doxiciclina,

inibidor não seletivo de MMPs (79). A doxíciclina em altas doses inibiu a MMP-2, hipertrofia vascular e aumentou a dilatação dos vasos em modelo de hipertensão 2R-1C (2 rins 1 clipe) (81). Adicionalmente, os níveis de MMP-9 e 2 aumentaram após tratamento com Ang II (80) e níveis elevados de MMP-9 foram descritos no modelo SHR (*spontaneously hypertensive rats*) (82, 83). Já em estudos clínicos, os resultados da literatura são controversos. Por exemplo, estudo demonstrou que pacientes hipertensos nunca tratados têm maiores níveis de MMP-9 comparados com voluntários saudáveis(83), enquanto nenhuma diferença foi encontrada por outros autores (84). Além disso, um estudo recente constatou associação entre níveis circulantes de MMP-9 e TIMP-1 com risco de mortalidade independente da causa em indivíduos aleatoriamente randomizados do estudo *Uppsala Longitudinal Study of Adult Men* (85). As evidências apontadas tanto nos estudos experimentais quanto nos estudos clínicos nos sugerem fortemente que as gelatinases têm um importante papel no remodelamento cardiovascular que acompanha a hipertensão. Dadas as diferenças entre hipertensão leve a moderada e hipertensão resistente com relação aos aspectos clínicos, bioquímicos e risco cardiovascular, pode-se antever que os níveis de MMPs são diferentes nestas duas condições. Na hipertensão resistente, não houve diferenças nos níveis de MMP-9 e TIMP-1 entre HAR controlados e não controlados(86). No entanto, não há dados na literatura comparando os níveis de gelatinases e seus inibidores entre hipertensão resistente e leve a moderada.

#### **1.4 Estudos de associação genética na hipertensão resistente**

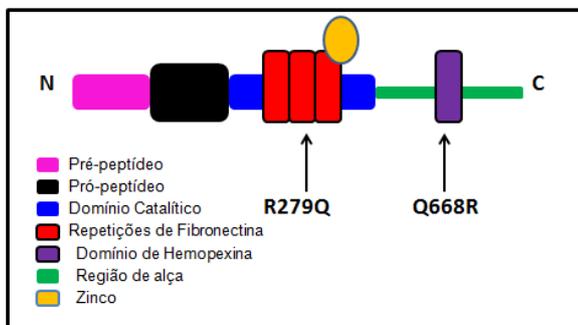
Alguns estudos têm sido conduzidos para determinar os genes que estão envolvidos na etiologia da hipertensão resistente e suas consequências, mas os dados genéticos disponíveis nesses pacientes ainda é escasso (87-91). O estudo GenHAT avaliou um painel de 78 SNPs e mostrou que duas variantes do gene do angiotensinogênio estão relacionados a presença de HAR em indivíduos brancos (92). Outros autores também investigaram a associação dos genes que codificam componentes relacionados ao sistema renina-angiotensina- aldosterona na hipertensão resistente (91, 93-95). Dados do estudo INVEST genes mostraram que a variação no gene *ATP2B1* é associado com aumento de risco para HAR (87). Por fim, outros autores demonstraram a relação entre variantes genéticas e resposta

pressórica a medicações (96-99) e prevalência de LOA (89) na HAR. É provável que múltiplos genes juntos sejam responsáveis pela regulação da pressão arterial e falta de resposta ao tratamento anti-hipertensivo.

### **1.5 Polimorfismos genéticos no gene da metaloproteinase 9**

O gene da MMP-9 está localizado no cromossomo 20 e possui 7.654 pares de bases (100). De acordo com a base de dados "dbSNPs" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) e utilizando para busca o número de identificação do gene da MMP-9 (ID:4318) no agrupamento GRCh38.p2 são encontrados 926 SNPs (*single nucleotide polymorphysm*). Diversos polimorfismos no gene da MMP-9 foram associados com condições cardiovasculares patológicas. Em pacientes hipertensos, o haplótipo "'T, H, Q" composto pelos polimorfismos -1562C>T (rs3918242), -90 (CA)(14-24) (rs2234681) e R279Q (rs17576) foi associado com IMVE e volume diastólico final (101). Ainda, a presença do alelo T do polimorfismo -1562 C>T foi associada com ocorrência de infarto do miocárdio com uma chance de risco de 1,23 em meta-análise (102) e, tanto a presença do alelo T como os genótipos CT + TT foram maiores em pacientes que tiveram acidente vascular cerebral (AVC) com uma razão de chance de 1,73 e 1,89, respectivamente, comparados aos controles(103). Portanto, essas variantes genéticas podem representar marcadores genéticos do fenótipo de hipertensão resistente. Uma meta-análise mostrou que o polimorfismo na região promotora do gene da MMP-9, -1562 C>T (rs3918242) foi associado com HAS onde pacientes portadores do alelo "T" têm maior risco de serem hipertensos (104). Estudo funcional utilizando um gene repórter para cada alelo e transferidos para macrófagos pulmonares de camundongos em cultura mostrou que a presença do alelo T aumentou em 2 vezes a taxa de transcrição do gene (105). Além disso, a variante do SNP R279Q (rs17576) que altera um aminoácido de Glutamina para Arginina foi associada com menor risco de AVC em hipertensos (106). Por fim, o estudo GenHAT identificou que o SNP não sinônimo Q668R (rs17577) no gene da MMP-9, que causa a troca de uma Arginina por Glutamina na posição 668 da proteína, é associado com doença coronariana em pacientes hipertensos tratados com Anlodipino entre um painel de 78 polimorfismos(107). Estes dois polimorfismos não sinônimos, o R279Q e Q668R,

alteram um aminoácido nos domínios de fibronectina e de hemopexina da MMP-9, respectivamente. O domínio de fibronectina é o sítio onde o colágeno e a gelatina se ligam; o domínio de hemopexina na porção C terminal, é local onde ocorre a ligação do TIMP às pró-MMPs (60). Por isso é provável que estes polimorfismos alterem a estabilidade da proteína e sua função (108). A estrutura da MMP-9 e a localização onde ocorre a troca desses aminoácidos esta esquematizada na figura 2. Até o momento, nenhum polimorfismo no gene da MMP-9 foi avaliado na HAR. Além disso, desvendar as bases genéticas da HAR pode contribuir para nosso esclarecimento em como as variantes genéticas podem afetar a resposta ao tratamento anti-hipertensivo e a ocorrência de LOA nesses pacientes.



**Figura 2:** Esquema da estrutura da MMP-9. Os polimorfismos R279Q e Q668R alteram um aminoácido nos domínios de fibronectina e de hemopexina respectivamente

## 2. OBJETIVOS

- 1- Determinar os níveis circulantes de MMP-9 do inibidor TIMP-1 nos grupos de hipertensos resistentes (HAR) e não resistentes (HAS);
- 2- Avaliar a associação entre os níveis plasmáticos da MMP-9 e TIMP-1 com o grau de rigidez arterial e hipertrofia ventricular nos diferentes grupos de hipertensos;
- 3- Determinar as frequências dos polimorfismos da MMP-9 (rs3918242, rs17576 e rs17577) nos dois grupos de hipertensos a fim de investigar a associação com HAR;
- 4- Avaliar a relação dos polimorfismos com os níveis plasmáticos de MMP-9 e com hipertrofia ventricular esquerda e rigidez arterial.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

O presente estudo refere-se a um estudo observacional transversal aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP (Parecer nº 188.161/2013) (ANEXO A).

#### **3.1 Seleção dos participantes**

Foram incluídos 124 pacientes hipertensos resistentes e 136 pacientes hipertensos não resistentes. Pacientes regularmente seguidos no Ambulatório de Hipertensão Resistente do Hospital de Clínicas, FCM-UNICAMP ou na Clínica de cardiologia Pinho em Valinhos, SP e/ou Hospital-Escola Celso Pierro, Campinas, SP em colaboração com o Prof. Dr. Claudio Pinho foram recrutados para o presente estudo. O protocolo de inclusão consistiu em 1- ter diagnóstico de hipertensão arterial leve, moderada ou resistente (10, 109); 2- estar em seguimento por no mínimo um período de 6 meses; 3- ser capaz de compreender, verbalizar e responder questões e 4-concordar em participar do estudo e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os pacientes foram classificados em resistentes (HAR) de acordo com o AHA Guidelines on Resistant Hypertension, 2008 (10). Foram excluídos do estudo pacientes com hipertensão secundária (hiperaldosteronismo primário, estenose de artéria renal, síndrome de Cushing, feocromocitoma e coarctação de aorta) e pseudo-resistentes (hipertensão do jaleco branco), insuficiência cardíaca (fração de ejeção <50% pelo ecocardiograma), gravidez e câncer. Foi realizada a monitoração ambulatorial de pressão arterial (MAPA-24h) para exclusão de hipertensão do jaleco branco(110). Nosso protocolo para identificação de HAR consiste em um período de 6 meses no qual na primeira consulta são agendados exames bioquímicos, MAPA, ecocardiograma e é realizado questionário em relação ao estilo de vida e dieta e questionário de Berlim (para identificação de suspeita de apneia obstrutiva do sono). No primeiro retorno, após um mês, o laudo de MAPA nos permite determinar a presença ou ausência de hipertensão do jaleco branco. Caso haja suspeita de HAS secundária são requisitados os seguintes exames para (1) hipertensão renovascular – doppler das artérias renais (2) Feocromocitoma- tomografia ou ressonância magnética abdominal para suspeita de tumor adrenal abdominal ou cintilografia com MIBG I (Metaiodobenzilguanidina I), se suspeita de tumor

extra-abdominal; (3) Hiperaldosteronismo primário (Aldosterona/atividade renina plasmática  $\geq 30$  com aldosterona maior que 15 ng/dL (4) Hipercortisolismo- dosagens séricas de cortisol (8h de manhã) em amostras coletadas após uso de dexametasona em doses baixas (1 mg) (dia anterior às 23hrs). Nas visitas subsequentes, é realizado o ajuste de doses e assistência farmacêutica que realiza questionários de adesão de Morisky e contagem de comprimidos, além de instrução para adaptação de estilo de vida saudável.

### **3.2 Coletas de sangue e exames bioquímicos**

Os pacientes elegíveis para o estudo foram agendados para coleta e realização de exames bioquímicos de rotina solicitados aos pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Hipertensão Resistente do HC-FCM/UNICAMP que incluíram: glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA1c), colesterol total e frações, potássio, aldosterona e creatinina. Além disso, em visita independente, após 8 horas de jejum foram coletados 15 mL de sangue periférico obtido por punção venosa, sendo 10 mL coletados em coagulante heparina e 5mL em EDTA. A amostra de sangue total em heparina foi centrifugada à 5300 rpm por 3 minutos sendo o plasma separado em alíquotas de 1mL e congelado imediatamente em gelo seco. As amostras de plasma heparina foram mantidas à  $-80^{\circ}\text{C}$  e as amostras de sangue total em EDTA à  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização.

As determinações das concentrações de MMP-9 e TIMP-1 foram realizadas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA- *enzyme-linked immunosorbent assay*) de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, EUA). A técnica consiste em reações individuais utilizando anticorpos específicos contra MMP-9 (número do catálogo DMP900), que é específico para ambas formas de pro-MMP-9 de 92KDa e para a forma ativa de 82 kDa, ou para o TIMP-1 (número do catálogo DTM100). Um anticorpo monoclonal é imobilizado em uma microplaca com 96 poços. Os padrões em 8 concentrações diferentes e as amostras são pipetados em duplicatas, assim a MMP-9/TIMP-1 presente nas amostras se ligará ao anticorpo imobilizado. Após repetidas lavagens para retirar substâncias não ligadas, é adicionado anticorpo policlonal específico ligado a uma enzima (peroxidase), e por fim, é adicionado o substrato dessa

enzima (peróxido de hidrogênio) que produzirá cor proporcionalmente a quantidade de MMP-9/TIMP-1 presente nas amostras.

### **3.3 Medidas da pressão arterial**

As medidas da pressão arterial foram realizadas com esfigmomanômetro digital (HEM-907 XL OMRON) devidamente calibrado e aferido (111), com manguito de tamanho apropriado para a circunferência braquial do indivíduo e seguindo as orientações das VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (109). À chegada do paciente para o protocolo, cada indivíduo ficou em repouso em uma poltrona hospitalar por período de relaxamento de 5 a 15 minutos. O paciente permaneceu sentado confortavelmente com o braço apoiado em um suporte, mantendo o mesmo à altura do ápex cardíaco. Foram obtidas 3 medidas da PA em cada braço em ambiente calmo, sendo precedidas por período de no mínimo de 60 minutos após ingestão de café ou 30 minutos após consumo de cigarro. Foi considerada para análise a média das últimas duas medidas do braço em que a PA foi mais elevada.

### **3.4 Avaliação da velocidade de onda de pulso (VOP)**

A VOP é uma técnica não invasiva e considerada padrão ouro para determinação de rigidez arterial. As medidas de VOP foram realizadas no mesmo dia da coleta das amostras biológicas e conforme as recomendações do consenso europeu que preconiza temperatura ambiente de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , repouso de pelo menos 10 minutos, jejum e não ingestão de café por pelo menos 3 horas. Não foi permitido aos pacientes dormirem ou falarem durante a realização do exame (112). Foi utilizado um sistema automatizado (The Sphygmocor System - Artcor, Sidney, Austrália) (112, 113) que avaliou a rigidez arterial pelo método de tonometria por aplanção. Com o paciente em posição supina, o tonômetro é apoiado sobre o ponto mais forte de pulsação das artérias carótida direita e femoral direita registrando a onda de pulso nesses dois pontos. Um eletrocardiograma é realizado simultaneamente e permite através da onda R do (ECG) e a base da onda de pulso, calcular o tempo que a onda de pulso leva para percorrer este trecho da aorta. A distância entre estes dois pontos é feita por fita métrica e fornecida ao software para o cálculo da velocidade através da fórmula “velocidade= distância/ tempo”.

Foi utilizada a média de duas medidas consecutivas. É considerado como lesão de órgão alvo subclínica a VOP acima de 10 m/s (114).

### **3.5 Avaliação da hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE)**

Os parâmetros ecocardiográficos foram obtidos dos prontuários dos pacientes quando realizados há no máximo 6 meses da data do protocolo de pesquisa. A massa do ventrículo esquerdo (MVE) foi calculada pela fórmula de Devereux modificada a partir de exame ecocardiográfico. Na fórmula utilizamos os seguintes parâmetros: medidas da espessura do septo interventricular (SIVD), da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVED) e do diâmetro ventricular esquerdo na diástole (DDVE), sendo esta:  $MVE = 0,8 [1,04 (SIVD + DDVE + PPVED)^3 - (DDVE)^3] + 0,6$ . Foi realizado o cálculo do índice de massa ventricular (IMVE) dividindo a MVE pela superfície corporal e também, o cálculo da relação volume massa de ventrículo esquerdo dividindo a MVE pelo DDVE. Os valores expressos em grama (g), grama/superfície corpórea (g/SC) e volume/massa (V/M), respectivamente. Os valores de IMVE são expressos grama/superfície corpórea (g/SC). A presença de HVE foi definida como IMVE maior que 95g/m<sup>2</sup> para mulheres e 115g/m<sup>2</sup> para homens (115). Além disso, a fração de ejeção (FE) foi calculada a partir da estimativa do volume diastólico final (VDF) e volume sistólico final (VSF) utilizando a fórmula:  $FE = (VDF - VSF) / VDF$  (115).

### **3.6 Genotipagens**

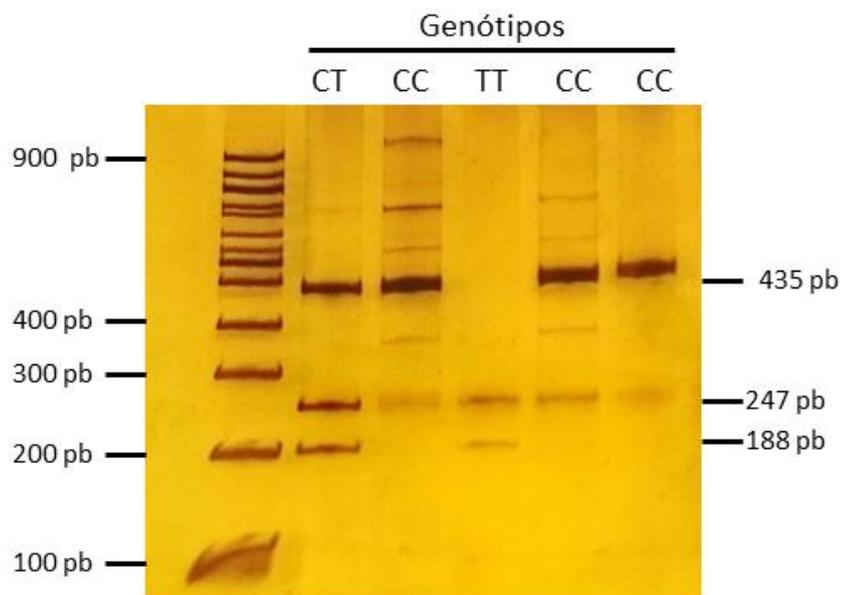
A extração de DNA genômico de sangue total foi realizada utilizando o Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare Life Sciences, USA). Inicialmente, as células são lisadas e ocorre a desproteínação pela adição de um sal caotrópico em tampão de lise na presença de proteinase K. O sal promove a ligação seletiva do DNA genômico à membrana de sílica e, após centrifugação, as proteínas desnaturadas são coletadas em um tubo e descartadas. Os contaminantes celulares são removidos por etapas de lavagens com tampão e etanol. Por fim, o DNA é eluído com 200uL de tampão de eluição. A medida da concentração e da qualidade do DNA foram realizadas através do NanoDrop™ LiteSpectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

A razão 260/280 foi avaliada para verificar contaminações com proteínas sendo que amostras com razão de  $\geq 1,8$  foram consideradas puras.

Os polimorfismos R279Q (rs17576) e Q668R (rs17577) da MMP-9 foram determinados por PCR em tempo real através do método de detecção TaqMan®, números de ensaio C\_11655953\_10 and C\_11655948\_1 respectivamente (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações foram realizadas com uma mistura de 20 ng DNA total, 1x TaqMan master mix (Applied Biosystems, USA), 900 nM de cada primer e 200 nM de cada sonda.

A reação de cadeia de polimerase (PCR) é uma metodologia que possibilita a síntese de DNA usando a enzima DNA-polimerase, a qual sintetiza uma sequência complementar de DNA a partir de uma sequência iniciadora (*primer*) que está ligado ao DNA na região escolhida para síntese. A sonda Taqman é um fragmento de DNA marcado com um fluoróforo e um quencher (molécula que inibe a energia do fluoróforo). A sonda Taqman é utilizada para identificar segmentos específicos de DNA amplificados na PCR. Durante a PCR, a sonda hibridiza-se ao DNA se tiver afinidade, e durante a amplificação, a sonda é degradada devido à atividade da polimerase separando o quencher da molécula fluorescente e assim, aumentando a intensidade de fluorescência. Para genotipagem, são adicionadas uma sonda para cada alelo com diferentes fluoróforos. Ao fim da PCR, a identificação da fluorescência emitida permite a genotipagem das amostras (116).

O terceiro polimorfismo, o -1562C>T (rs3918242) foi determinado pela técnica de “Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição” (RFLP- *Restriction fragment length polymorphism*), que consiste de uma PCR seguida de eletroforese. Os primers usados no PCR, para amplificar uma sequência de 435 nucleotídeos, contendo o sítio -1562 foram: *sense*: 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC- 3' e *antisense*: 5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3'(117). Os produtos amplificados foram digeridos com a enzima de restrição “*SphI*” (New England Biolabs) a 37 °C por 1 hora, e após separação por eletroforese em gel de poliácridamida 8%, as bandas foram visualizadas por meio de coloração por prata. Os fragmentos gerados foram de 247 e 188 pb para o alelo “T”, ou um fragmento único de 435 pb para o alelo mais comum “C” (figura 2).



**Figura 2: Genotipagem do polimorfismo -1562C>T na região promotora do gene da MMP-9.** Os produtos da PCR foram digeridos com a enzima de restrição *SphI* produzindo fragmentos de tamanhos diferentes. Gel de acrilamida corado com nitrato de prata. PB: pares de bases; C:citosina; T: Timina.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Artigo 1: “Alterations in Metalloproteinase 9 and tissue inhibitor 1 levels in resistant hypertension and the relationship with left ventricular hypertrophy”

Submetido ao *Journal of Hypertension* em 07 de abril de 2016

**Title: Alterations in Metalloproteinase 9 and tissue inhibitor 1 levels in resistant hypertension and the relationship with left ventricular hypertrophy**

**Authors:** Natália R. Barbaro<sup>1</sup>, Andrea R. Sabbatini<sup>1</sup>, Alessandra M. V. Ritter<sup>1</sup>, Ana Paula de Faria<sup>1</sup>, Nathalia B. Correa<sup>1</sup>, Veridiana Brunelli<sup>1</sup>, Rodrigo Modolo<sup>1</sup>, Cláudio Pinho<sup>2</sup>, Vanessa Fontana<sup>1</sup>, Heitor Moreno<sup>1</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Laboratory of Cardiovascular Pharmacology, Faculty of Medical Sciences and Teaching Hospital – University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Faculty of Medicine - Pontifical Catholic University of Campinas (PUC-Campinas), Campinas, SP, Brazil.

**Corresponding author:**

Heitor Moreno Jr, M.D., PhD, Professor

Laboratory of Cardiovascular Pharmacology, Department of Internal Medicine

Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. Zipcode: 13083-887

Phone: +55 19 3521 9538; email: hmoreno@uol.com.br

**ABSTRACT**

Resistant hypertensive patients (RHTN) have unfavorable prognosis due to poor blood pressure (BP) control and higher prevalence of target organ damage. Deregulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors are related to cardiac remodeling and left ventricular geometry in cardiac diseases. This study aimed to evaluate the plasma levels of MMP-9 and TIMP-1 in resistant hypertensive patients compared to mild to moderate hypertensive (HTN) and the association between MMP-9 and TIMP-1 levels and the presence of LVH. Higher levels of TIMP-1 (median[IQR]) were found in RHTN (88.2 [77.4- 100.8] ng/mL), compared with HTN individuals (79.7 [67.5- 99.6]  $p=0.015$ ), while low levels of MMP-9 (23.9 [19.8 -54.2] vs. 38.1 [24.8 -64.0],  $p=0.003$ ) and consequently, decreased MMP-9/TIMP-1 ratio were observed in RHTN group (0.30 [0.20-0.56] vs. 0.53 [0.33- 0.85],  $p < 0.0001$ ). Different patterns of correlation were observed of TIMP-1 with LVMI in the subgroups; in mild to moderate hypertensive patients, a positive correlation was observed ( $r=0.20$ ,  $p=0.02$ ) whereas in RHTN, TIMP-1 levels were inversely correlated with LVMI ( $r= -0.32$   $p=0.005$ ). Interestingly, multiple regression analysis showed that TIMP-1 levels are independent predictors for LVMI in RHTN but not in HTN subgroup. Our data suggest that MMP-9/TIMP-1 balance varies according to the severity of hypertension and are associated with resistant hypertension and left ventricular hypertrophy.

## INTRODUCTION

Resistant hypertensive patients (RHTN) have unfavorable prognosis due to poor blood pressure (BP) control and high prevalence of target organ damage [1-3]. Left ventricular hypertrophy (LVH) is an important predictor of mortality and morbidity and it is related to major cardiovascular events such as stroke, myocardial infarction, heart failure and death [4-5]. Left ventricular (LV) mass increases according to severity of hypertension [6] and echocardiographic parameters such as LV mass and LV mass index (LVMI) are increased in RHTN patients compared to controlled hypertensive subjects [7]. Moreover, some characteristics commonly found in RHTN patients including age, obesity and high blood pressure are associated with LVH [8-10].

High blood pressure or volume overload leads to structural and functional changes in the myocardium, which in turn will result in hypertrophy of the left ventricle. Several other factors beyond BP participate in left ventricular remodeling as well, such as angiotensin II, aldosterone, and/or catecholamines[11]. In addition, left ventricular hypertrophy is a result of increase in the size of cardiomyocytes, proliferation of fibroblasts and changes in extracellular matrix (ECM) [11]. The families of zinc dependent enzymes matrix metalloproteinases (MMPs) are important regulators of ECM composition in cardiovascular tissues. These enzymes are responsible for turnover of the extracellular matrix, which mediate tissue remodeling and may contribute to cardiac complications [12]. MMP-9 is a gelatinase-type metalloproteinase that has been associated with cardiovascular diseases, including hypertension [12-13]. In this study, we aimed to evaluate the plasma levels of MMP-9 and TIMP-1 in resistant hypertensive patients compared to mild to moderate hypertensive (HTN). Moreover, we evaluated the relationship of these circulating markers with left ventricular hypertrophy.

## METHODS

### *Study Population*

This cross-sectional study was performed in the Outpatient Resistant Hypertension Clinic at the Hospital of the University of Campinas. Seventy nine patients classified as resistant

hypertensive and 116 mild to moderate hypertensive patients (HTN) were consecutively included in this study. The diagnosis of RHTN was performed according to the 2008 AHA Scientific Statement [14]. Resistant hypertension is defined as BP that remains above goals despite of the concurrent use of 3 antihypertensive agents of different classes, including a diuretic, at optimal dose amounts. Also, patients whose BP are controlled but require 4 or more medications are considered resistant [14-15]. Proper office BP measurement technique and ambulatory BP monitoring (ABPM) were performed to confirm persistently elevated BP levels. We performed physical examination, complete medical history inquiry, electrocardiogram and laboratory testing in all individuals. Exclusion criteria included secondary hypertension (identifiable and removable causes of hypertension, including Conn's or Cushing's syndrome, renal artery stenosis, pheochromocytoma, coarctation of the aorta), liver and renal disease, heart failure (ejection fraction < 50% by echocardiogram), peripheral vascular disease, pregnancy or oral contraceptive use. Hypertensive patients underwent antihypertensive therapy optimization and were evaluated for adherence to treatment by questionnaire [16]. The study was approved by Research Ethics Committee at the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Sao Paulo, Brazil (approval no. 188.161/2013) and according to the last version of the Declaration of Helsinki.

#### *Echocardiography*

Left ventricular dimensions were evaluated according to the American Society of Echocardiography recommendations using cardiovascular ultrasound machine (Siemens Acuson CV70, Munich, Bavaria, Germany) with multi-frequency sector transducer (2-4MHz) [17]. Devereaux formula was used to estimate LV mass. Left ventricular mass index (LVMI) was calculated by dividing the LV mass by the body surface area. Left ventricular hypertrophy (LVH) was defined by LVMI above  $95\text{g/m}^2$  for women and  $115\text{g/m}^2$  for men [18].

#### *Biochemical measurements*

Heparin-anticoagulated blood samples were collected at 8:00 hour after overnight fasting. The blood samples were centrifuged at  $2,000 \times g$  for 10 min and plasma fractions were immediately stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used for biochemical measurements. Plasma levels of MMP-9

and TIMP-1 were determined by ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) according to manufacturer's instructions. In addition, serum cholesterol, fasting glucose, LDL, HDL, triglycerides, HbA1C, aldosterone, creatinine were measured.

#### *Statistical analysis*

Continuous variables were expressed as means  $\pm$  SD or median [Interquartile Range(IQR)]. Bivariate comparisons between hypertensive groups were performed by Unpaired t-test or Mann –Whitney test. Categorical data were presented in percentages and compared by Fisher's exact test. Spearman's correlation was performed between TIMP-1 and LVMI. Multivariate logistic regression analyses were used to explore variables associated with resistant hypertension (MMP-9, TIMP-1, age, BMI, SBP, black race and presence of type II diabetes) while multivariate linear regression evaluated the association of TIMP-1 with LVMI adjusted for possible confounders (age, SBP and BMI). LVMI was log<sub>10</sub> transformed because of its skewed distribution. Statistical analyses were performed by GraphPad Prism 5.00 (San Diego California, USA) and SigmaPlot 12.0 (Germany) two-tailed P values less than 0.05 were accepted as significant.

## **RESULTS**

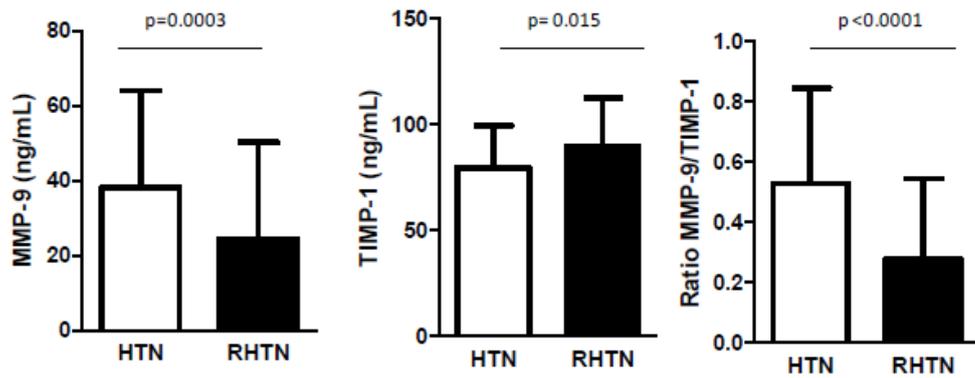
General characteristics are shown in table 1. Similar age and gender distribution were observed between the groups. As expected, resistant hypertensive patients had higher office blood pressure, higher BMI, increased fasting glucose and Hb1A1c, increased aldosterone levels and prevalence of LVH compared to HTN (table 1). Higher levels of TIMP-1 (median [IQR]) were found in RHTN (88.2 [77.4- 100.8] ng/mL), compared with HTN individuals (79.7 [67.5- 99.6]  $p=0.015$ ), while lower levels of MMP-9 (23.9 [19.8 -54.2] vs. 38.1 [24.8 -64.0],  $p=0.003$  ) and consequently, decreased MMP-9/TIMP-1 ratio was observed in RHTN group (0.30 [0.20-0.56] vs. 0.53 [0.33- 0.85],  $p <0.0001$ ) (Figure 1). Multivariate logistic regressions analyses demonstrated that TIMP-1, MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratio were associated with resistant hypertension adjusted for age, BMI, office SBP, presence of type II diabetes and race (table 2). In addition, patients from both hypertensive subgroups were classified according to

the presence of LVH. We found that patients who had left ventricular hypertrophy showed decreased MMP-9/TIMP-1 ratio compared to patients who had not LVH (0.35 (0.22- 0.67) vs 0.42 (0.26-0.82)  $p=0.04$ ), but similar MMP-9 and TIMP-1 levels. In HTN patients, TIMP-1 was positively correlated with LVMI ( $r=0.20$ ,  $p=0.02$ ) whereas in resistant hypertensive patients, TIMP- 1 levels were inversely correlated with LVMI ( $r= -0.32$   $p=0.005$ ) (Figure 2). No correlations were found with TIMP-1 and other echocardiography parameters, besides LVMI and LVM (table 4). Interestingly, multiple regression analysis showed that TIMP-1 levels are independent predictor for LVMI in RHTN but not in HTN subgroup (table 3). On the other hand MMP-9 levels were not correlated with LVMI in both groups (data not shown). Neither TIMP-1 nor MMP-9 were correlated with systolic or diastolic ABPM (data not shown).

**Table 1: General characteristics of study groups**

	HTN (n=116)	RHTN (n=79)	p- value
Age (years)	63 ± 9	61 ± 10	0.05
Gender (female/male)	72/44	52/27	0.65
Black Race (%)	16	51	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.3±4.7	31.6±6.4	0.002
Office SBP (mmHg)	139 [132-148]	148 [134-163]	0.003
Office DBP (mmHg)	82 [77-86]	83 [78-93]	0.16
Heart rate (bpm)	66 [61-74]	65 [58-73]	0.18
ABPM SBP (mmHg)	127±11	130±17	0.67
ABPM DBP (mmHg)	77±8	77±13	0.96
LVMI (g/m <sup>2</sup> )	96 [86.4-117]	115 [93-141]	<0.001
LVH (%)	22	61	<0.001
Fasting Glucose (mg/dL)	97 [91-107]	105 [91-137]	0.03
HbA1C (%)	6.0 [5.7-6.4]	6.3 [5.8-7.1]	0.01
Total cholesterol (mg/dL)	167.7 ± 35.8	177.1±38.6	0.09
LDL (mg/dL)	87 [70.7-108]	92 [77-120]	0.11
HDL (mg/dL)	49 [40.3-56.8]	47 [39-57]	0.36
Triglycerides	104.5 [81-159.3]	117.5 [88.5-175.5]	0.31
K (mEq/L)	4.3 [4.1-4.5]	4.4[4.2-4.8]	0.04
Aldosterone (pg/mL)	62 [43-108.5]	90 [49-187.2]	0.005
Creatinine (mg/dL)	0.92 [0.78-1.1]	0.93 [0.77-1.18]	0.59
<b>Drugs</b>			
Number of antihypertensive drugs, mean±SD	2.1 ± 0.71	4.5 ± 0.97	<0.001
Thiazide Diuretics (%)	63	95	<0.001
Spirolactone (%)	1.5	44	<0.001
ACEi (%)	18	35	0.006
ARB (%)	72	61	0.099
CCB (%)	42	89	<0.001
Beta-blockers (%)	16	75	<0.001
Sympatholytic drugs (%)	1.5	30	<0.001
Statins (%)	75	63	0.752

HTN: mild to moderate hypertensive; RHTN: resistant hypertensive patients; BMI: body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; LVMI: left ventricular mass index; LVH: left ventricular hypertrophy; HbA1C, glycated hemoglobin; ACEi, angiotensin I-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; CCB, calcium channel blocker. Data expressed as Mean ± SD or median [IQR] according to distribution.

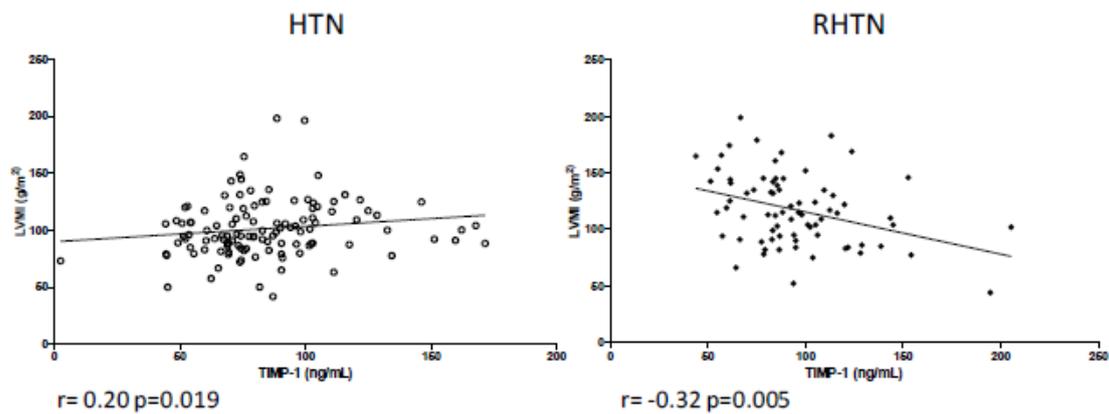


**Figure 1:** Metalloproteinase 9, TIMP-1 levels and MMP-9/TIMP-1 ratio of study groups. HTN: mild to moderate hypertensive; RHTN: resistant hypertensive patients. Median [IQR]. Mann –Whitney test.

**Table 2:** – Multivariate logistic regression analysis to explore variables associated with resistant hypertension

	Odds Ratio (95% CI)	P- value
MMP-9 (ng/mL)	0.99 (0.98-0.99)	0.032
TIMP-1 (ng/mL)	1.02 (1.01-1.03)	0.003
MMP-9/ TIMP-1	0.38 (0.18-0.77)	0.007

The three independent analyses were adjusted by age, BMI, SBP, presence of type II diabetes and race.



**Figure 2:** Spearman's correlation of TIMP-1 and LVMI in HTN and RHTN subjects. HTN: mild to moderate hypertensive; RHTN: resistant hypertensive patients.

**Table 3:** – Multiple linear regression to explore variables associated with log- transformed LVMI.

	$\beta$	SEM	<i>p value</i>
<b>Model 1</b>			
<b>RHTN patients (n=75)</b>			
Constant	2.065	0.175	<0.001
TIMP-1 (ng/mL)	-0.0014	0.0005	0.005
Age (yr)	0.0015	0.001	0.305
Office SBP (mmHg)	0.0006	0.0006	0.351
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-0.0014	0.002	0.532
<b>Model 2</b>			
<b>HTN patients (n=116)</b>			
Constant	1.532	0.116	<0.001
TIMP-1 (ng/mL)	0.0005	0.0003	0.098
Age (yr)	0.003	0.001	<0.001
Office SBP (mmHg)	0.0003	0.0006	0.665
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.006	0.002	0.001

**Model 1:** R = 0.34. R<sup>2</sup> = 0.11; **Model 2:** R = 0.42, R<sup>2</sup> = 0.18

**Table 4:** Spearman's correlation of TIMP-1 and echocardiography parameters in HTN and RHTN subjects

	HTN (n=116)		RHTN (n=79)	
	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p
Septal (mm)	0.12	0.252	-0.14	0.238
Posterior wall thickness (mm)	0.12	0.198	-0.22	0.055
LVM(g)	0.22	0.019	-0.29	0.011
LVMI (g/m <sup>2</sup> )	0.20	0.028	-0.32	0.005
LV diastolic diameter (mm)	0.06	0.509	-0.12	0.286
Left atrial	0.06	0.487	0.17	0.148
Ejection fraction (%)	-0.08	0.3846	0.03	0.800

HTN: mild to moderate hypertensive; RHTN: resistant hypertensive patients. LVM: left ventricular mass; LVMI: left ventricular mass index; LV: left ventricular

## DISCUSSION

The main findings of this study were: 1) resistant hypertensive patients presented decreased levels of plasma MMP-9, increased TIMP-1 levels and decreased MMP-9/TIMP-1 ratio compared to mild to moderate hypertensive; 2) MMP-9, TIMP-1 and MMP-9/TIMP-1 ratio were associated with resistant hypertension independent of potential confounders; 3) TIMP-1 levels are positively correlated with LVMI in mild to moderate hypertension and negatively correlated in resistant hypertension; 4) TIMP-1 predicts LVMI in resistant hypertension but not in HTN group in adjusted analysis.

Matrix metalloproteinases and its inhibitors have been extensively studied in cardiovascular diseases and have been suggested as potential therapeutic targets [13]. Although MMP inhibition may be promising to some conditions such as prevention of vascular plaques rupture [19], its role in hypertension remains unclear. Several studies showed increased levels of both MMP-9 and TIMP-1 in hypertensive patients and animal models of hypertension compared to controls [20-23], while opposite findings were also described [24-26]. A meta-analysis revealed that higher MMP-9 and TIMP-1 were associated with hypertension. They suggested that plasma modulation of MMP-9 associated with hypertension may reflect subclinical cardiovascular remodeling, that contributes or accompany BP increase [27]. The conflicting data regarding the patterns of MMP/TIMP among studies may be explained by different characteristics of studied populations and methodological issues. Despite several studies on MMP-9, TIMP-1 levels and hypertension, resistant hypertension has been poorly studied. It is unknown if MMP-9 and its inhibitor have a causal role in hypertension and which additional factors might affect its activity in hypertension. A recent study showed similar levels of MMP-9 and TIMP-1 in a population of controlled vs uncontrolled RHTN patients [28], suggesting that there is no association between MMP-9 or TIMP-1 levels with blood pressure control in resistant hypertension. Although, study with knockout MMP-9 animals showed increased BP due to lower aortic distensibility and higher collagen accumulation after angiotensin infusion indicating that MMP-9 interfere with BP response in animals[29], we did not find correlation of both markers with BP. In RHTN pathophysiology, other factors such as hyperactivity of renin-aldosterone system and chronic

inflammation which may affect MMP-9/TIMP-1 system balance. Moreover, higher TIMP-1 levels predicted hypertension [30] and cardiovascular death in patients with cardiovascular diseases [31], suggesting that it might be associated with hypertension-induced cardiovascular remodeling instead of a direct effect on blood pressure.

The development of target organ damage is characterized by structural changes in the myocardium and arterial wall that is mediated by increased deposition of ECM components [11]. It was reported increased MMP-9 activity and higher distensibility in *ex-vivo* mouse carotid arteries under high pressure [32]. Also, MMP inhibition or MMP-9 knockout model prevented carotid distensibility in the animals [29]. Together, those findings indicate that at the initial stages of hypertension MMP-9 has a role in promoting vascular remodeling to accommodate the elevated tension on the vessel wall caused by high blood pressure.

In agreement with the animal findings, studies with patients reported increases in MMP-9 in mild to moderate hypertension compared to normotension [21-22]. Interestingly, we found decreased levels of MMP-9 and increased levels of TIMP-1 in resistant hypertension compared to mild to moderate HTN. Taking animal and human data we might speculate that, at initial stages of the disease, tissue remodeling is more active and MMP-9 is higher in never-treated and mild to moderate hypertensive. On the other hand, RHTN patients had a long-term high blood pressure and the remodeling process might be reduced because cardiac and vascular damage is already installed.

Cardiac damage is caused by adaptive processes in the heart in response to chronic pressure or volume overload, which activates mechanical signals that in turn results in left ventricular hypertrophy. LVH is characterized by cardiomyocytes hypertrophy, proliferation of fibroblasts and changes in collagen architecture [11]. As expected, studied RHTN patients presented higher prevalence of LVH compared to HTN. In addition, when we classified HTN and RHTN patients according to the presence of LVH, we found that patients with LVH had decreased ratio of MMP-9/TIMP-1 that reflects reduced global MMP-9 activity favoring collagen deposition. Interestingly, we observed different patterns of correlation between TIMP-1 and LVMI in HTN and RHTN groups. While in mild to moderate hypertensive, a positive correlation between

TIMP-1 and LVMI was observed, in RHTN patients the correlation was negative. We speculate that at initial stages of the disease, cardiac remodeling is more active and MMP-9 is higher in mild to moderate hypertensive compared to normotensive. With the progression of hypertension to resistant hypertension, MMP-9 system is suppressed favoring ECM deposition and fibrosis left ventricular hypertrophy (Figure 3). According to these data, a meta-analysis showed that hypertensive patients with LVH had higher TIMP-1 levels compared to those without LV hypertrophy [27], thus plasma TIMP-1 may reflect hypertensive cardiac remodeling. However, it is of note that the inverse correlation between TIMP-1 and LVMI may imply that reduced levels of TIMP-1 in already damaged heart would favor ECM disruption and may indicate a more severe cardiac remodeling or transition for LV dilation. In agreement with this possible explanation, in patients with heart failure – presenting cardiac dilation- MMP-9 is unregulated and TIMP-1 is reduced reflecting the process of disruption of extracellular matrix [33]. In summary, these data suggest that hypertension progression shows a transitory modulation of MMP-9 and its inhibitor concomitantly to cardiac disease progression. However, in the present study no evidence of relationship of MMP-9 or TIMP-1 cardiac function parameters were found. However, in this study we did not include patients with abnormal range of ejection fraction.

Importantly, TIMPs have different activities rather than MMP inhibition which may favor cardiac fibrosis by distinct mechanisms [34]. For example, overexpression of TIMP-1 in cardiac fibroblasts stimulated myofibroblasts differentiation and production of collagen [35-36]. These effects were not observed with MMP inhibitor, suggesting it is a MMP-independent action of TIMP [37]. Moreover, higher levels of TIMP-1 were associated with LV hypertrophy [38], incidence of hypertension [39] and occurrence of major adverse cardiac events after acute myocardial infarction [40]. TIMP-1 was suggested as a marker of myocardial fibrosis [41] being predictive of LV dysfunction [42] and cardiovascular death[31].

We are aware that MMP-9 and TIMP-1 levels might be affected by anti-hypertensive and other cardiovascular drugs, however this is an intrinsic characteristics of resistant hypertension.

Studies are conflicting regarding the interference of anti-hypertensive on MMPs [26, 43-44]. In addition, plasma levels of MMP-9 and TIMP-1 may not reflect the tissue concentrations. Finally, this is a cross-sectional study and no cause-effect relationship can be inferred.

In conclusion, RHTN patients had higher TIMP-1 levels, lower MMP-9 levels and decreased MMP-9/TIMP-1 ratio compared to HTN patients. Decreased MMP-9/TIMP-1 ratio might be associated with late-stage of left ventricular remodeling in resistant hypertension. Our data suggest that MMP/TIMP balance varies according to the severity of hypertension and are associated with resistant hypertension and left ventricular hypertrophy.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (Capes), Brazil.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors have no conflicts of interest to declare

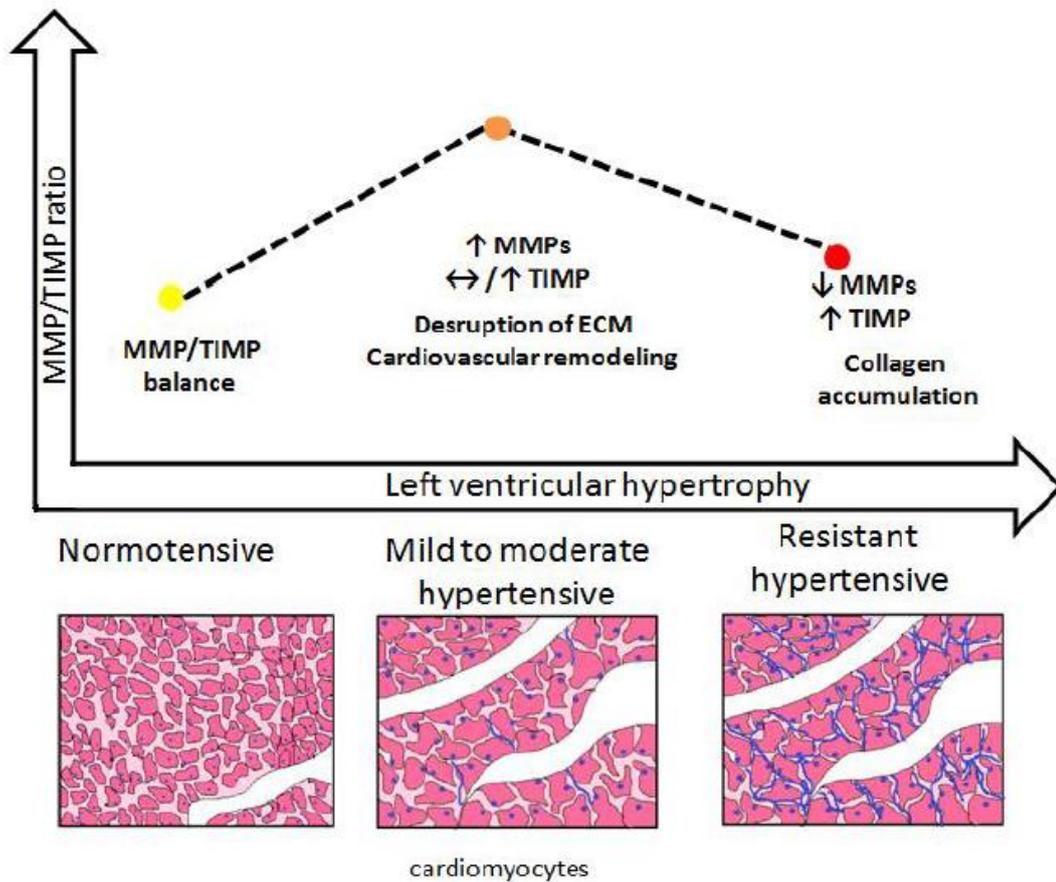


Figure 3: Proposed relationship of MMP system and left ventricular hypertrophy in hypertension. High blood pressure stimulates increases in MMP-9 production and disruption of extra cellular matrix leading to structural changes in the myocardium such as cardiomyocytes hypertrophy, proliferation of fibroblasts and changes in collagen architecture. With the progression of disease, resistance to anti-hypertensive treatment, the MMP system is downregulated causing ECM deposition and fibrosis that accompany left ventricular hypertrophy progression.

## References

1. Daugherty, S.L., et al., *Incidence and prognosis of resistant hypertension in hypertensive patients*. *Circulation*, 2012. **125**(13): p. 1635-42.
2. Sim, J.J., et al., *Comparative risk of renal, cardiovascular, and mortality outcomes in controlled, uncontrolled resistant, and nonresistant hypertension*. *Kidney Int*, 2015. **88**(3): p. 622-32.
3. Modolo, R., et al., *Refractory and resistant hypertension: characteristics and differences observed in a specialized clinic*. *J Am Soc Hypertens*, 2015. **9**(5): p. 397-402.
4. Tsao, C.W., et al., *Left Ventricular Structure and Risk of Cardiovascular Events: A Framingham Heart Study Cardiac Magnetic Resonance Study*. *J Am Heart Assoc*, 2015. **4**(9).
5. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. *N Engl J Med*, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
6. Vakili, B.A., P.M. Okin, and R.B. Devereux, *Prognostic implications of left ventricular hypertrophy*. *Am Heart J*, 2001. **141**(3): p. 334-41.
7. Cuspidi, C., et al., *High prevalence of cardiac and extracardiac target organ damage in refractory hypertension*. *J Hypertens*, 2001. **19**(11): p. 2063-70.
8. Ruilope, L.M. and R.E. Schmieder, *Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients*. *Am J Hypertens*, 2008. **21**(5): p. 500-8.
9. Nadruz, W., *Myocardial remodeling in hypertension*. *J Hum Hypertens*, 2015. **29**(1): p. 1-6.
10. Martins, L.C., et al., *Characteristics of resistant hypertension: ageing, body mass index, hyperaldosteronism, cardiac hypertrophy and vascular stiffness*. *J Hum Hypertens*, 2011. **25**(9): p. 532-8.
11. Lorell, B.H. and B.A. Carabello, *Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis*. *Circulation*, 2000. **102**(4): p. 470-9.
12. Fontana, V., et al., *Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension*. *Clin Chim Acta*, 2012. **413**(7-8): p. 656-62.
13. Azevedo, A., et al., *Matrix metalloproteinases are involved in cardiovascular diseases*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014. **115**(4): p. 301-14.
14. Calhoun, D.A., 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*. *Hypertension*, 2008. **51**(6): p. 1403-19.
15. Moreno, H., Jr. and A. Coca, *Resistant and refractory hypertension: reflections on pathophysiology and terminology*. *Blood Press*, 2012. **21**(4): p. 209-10.
16. de Souza, W.A., et al., *Effect of pharmaceutical care on blood pressure control and health-related quality of life in patients with resistant hypertension*. *Am J Health Syst Pharm*, 2007. **64**(18): p. 1955-61.
17. Lang, R.M., et al., *Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2005. **18**(12): p. 1440-63.
18. Lang, R.M., et al., *Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2015. **28**(1): p. 1-39 e14.
19. Galis, Z.S. and J.J. Khatri, *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly*. *Circ Res*, 2002. **90**(3): p. 251-62.

20. Tayebjee, M.H., et al., *Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT)*. Am J Hypertens, 2004. **17**(9): p. 764-9.
21. Derosa, G., et al., *Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension*. Endothelium, 2006. **13**(3): p. 227-31.
22. Fontana, V., et al., *Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011. **109**(2): p. 130-7.
23. Gkaliagkousi, E., et al., *Elevated levels of MMP-9 in untreated patients with stage I essential hypertension*. Clin Exp Hypertens, 2012. **34**(8): p. 561-6.
24. Ergul, A., et al., *Downregulation of vascular matrix metalloproteinase inducer and activator proteins in hypertensive patients*. Am J Hypertens, 2004. **17**(9): p. 775-82.
25. Zervoudaki, A., et al., *Plasma levels of active extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment*. J Hum Hypertens, 2003. **17**(2): p. 119-24.
26. Li-Saw-Hee, F.L., et al., *Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 levels in essential hypertension. Relationship to left ventricular mass and anti-hypertensive therapy*. Int J Cardiol, 2000. **75**(1): p. 43-7.
27. Marchesi, C., et al., *Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and meta-analysis*. Journal of Hypertension, 2012. **30**(1): p. 3-16.
28. Lacerda, L., et al., *Role Of MMP-2 and MMP-9 in Resistance to Drug Therapy in Patients with Resistant Hypertension*. Arq Bras Cardiol, 2015. **105**(2): p. 168-75.
29. Flamant, M., et al., *Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling*. Hypertension, 2007. **50**(1): p. 212-8.
30. Dhingra, R., et al., *Relations of Matrix Remodeling Biomarkers to Blood Pressure Progression and Incidence of Hypertension in the Community*. Circulation, 2009. **119**(8): p. 1101-U62.
31. Lubos, E., et al., *Prognostic value of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 for cardiovascular death among patients with cardiovascular disease: results from the AtheroGene study*. Eur Heart J, 2006. **27**(2): p. 150-6.
32. Lehoux, S., et al., *Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling*. Circulation, 2004. **109**(8): p. 1041-7.
33. Li, Y.Y., et al., *Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart*. Circulation, 1998. **98**(17): p. 1728-34.
34. Westermann, D. and S. Heymans, *Fibrosis or hypertrophy: let TIMPs decide*. Cardiovasc Res, 2014. **103**(2): p. 196-7.

35. Lovelock, J.D., et al., *Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(2): p. H461-8.
36. Lambert, E., et al., *TIMPs as multifacial proteins*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004. **49**(3): p. 187-98.
37. Heymans, S., et al., *Loss or inhibition of uPA or MMP-9 attenuates LV remodeling and dysfunction after acute pressure overload in mice*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(1): p. 15-25.
38. Ahmed, S.H., et al., *Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease*. *Circulation*, 2006. **113**(17): p. 2089-96.
  
39. Dhingra, R., et al., *Relations of matrix remodeling biomarkers to blood pressure progression and incidence of hypertension in the community*. *Circulation*, 2009. **119**(8): p. 1101-7.
40. Kelly, D., et al., *Usefulness of plasma tissue inhibitors of metalloproteinases as markers of prognosis after acute myocardial infarction*. *Am J Cardiol*, 2010. **106**(4): p. 477-82.
41. Heymans, S., et al., *Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart*. *Circulation*, 2005. **112**(8): p. 1136-44.
42. Lindsay, M.M., P. Maxwell, and F.G. Dunn, *TIMP-1: a marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension*. *Hypertension*, 2002. **40**(2): p. 136-41.
43. Fontana, V., et al., *Comprehensive evaluation of the effects of enalapril on matrix metalloproteinases levels in hypertension*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2012. **26**(6): p. 511-9.
44. Martinez, M.L., et al., *Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. **47**(1): p. 117-22.

**4.2 Artigo 2:** “*Genetic polymorphisms of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in resistant hypertension*”

**Title: Genetic polymorphisms of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in resistant hypertension**

**Authors:** Natália R. Barbaro<sup>a</sup>, Andrea R. Sabbatini<sup>a</sup>, Alessandra M. V. Ritter<sup>a</sup>, Ana Paula de Faria<sup>a</sup>, Rodrigo Modolo<sup>a</sup>, Claudio Pinho<sup>b</sup>, Vanessa Fontana<sup>a</sup>, Heitor Moreno<sup>a</sup>

**Affiliations:**

<sup>a</sup>Laboratory of Cardiovascular Pharmacology, Faculty of Medical Sciences and Teaching Hospital – University of Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil.

<sup>b</sup>Faculty of Medicine - Pontifical Catholic University of Campinas (Puccamp), Campinas, SP, Brazil.

**Corresponding author:**

Heitor Moreno, M.D., PhD.

Laboratory of Cardiovascular Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Phone: +55 19 3521 9538; email: [hmoreno@uol.com.br](mailto:hmoreno@uol.com.br)

### *Abstract*

Resistant hypertension (RHTN) represents an extreme phenotype of hypertension. RHTN may be affected, at least in part, for genetic variability in individual genetic architecture. MMP-9 is a gelatinase that has been involved in cardiovascular diseases including hypertension. Polymorphisms in MMP-9 gene has been associated with cardiovascular conditions, including left ventricular hypertrophy (LVH), myocardial infarction and stroke. We aimed to evaluate whether the polymorphisms in MMP-9 gene: -1562C>T (rs3918242), R279Q (rs17576) and Q668R (rs17577) were associated with resistant hypertension. Secondly, we evaluated the association of these polymorphisms and MMP-9 levels, blood pressure (BP), LVH and arterial stiffness (AS). One hundred twenty four RHTN and 136 HTN patients were included in this study. MMP-9 levels were determined by ELISA and genotypes for R279Q (rs17576) and Q668R (rs17577) were obtained by TaqMan assay and for -1562C>T (rs3918242) by RFLP. Haplotypes were estimated using Bayesian method estimation. We found no differences in genotype, allele and haplotype frequencies between the RHTN and HTN subjects. Moreover, no differences were found in MMP-9 levels, LVH or AS prevalence among the MMP-9 genotypes for all polymorphisms or haplotypes in both groups. RHTN patients who carried G allele of R279Q polymorphism had lower diastolic BP than AA homozygote, but the association was not significant after adjustment for age, race, BMI and diabetes. In conclusion, the MMP-9 polymorphisms studied were not associated with resistant hypertension, nor with the prevalence of left ventricular hypertrophy and arterial stiffness in hypertensive subjects.

### ***Introduction***

Resistant hypertension (RHTN) is associated with increased risk for cardiovascular events<sup>1-3</sup>. RHTN phenotype includes high prevalence of target organ damage, obesity and diabetes<sup>4-5</sup>. There are several clinical factors associated with increased risk for resistant hypertension such as obesity, aldosterone levels, black race and age<sup>6</sup>. However, the effect of genetic factors has been poorly studied in this multifactorial condition<sup>7-9</sup>.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc dependent enzymes that regulates extracellular matrix composition in cardiovascular tissues. Among the MMPs, MMP-9 is a gelatinase that has been involved in cardiovascular diseases, including hypertension<sup>10-11</sup>. MMP-9 activity is modified at both post-translational and transcriptional levels. Several polymorphisms in MMP-9 gene and their association with cardiovascular conditions such as left ventricular hypertrophy (LVH)<sup>12</sup>, myocardial infarction<sup>13</sup> and stroke<sup>14</sup> have been described. Recent data showed that the -1562 C>T (rs3918242) polymorphism is associated with essential hypertension, patients who carried the “T” allele had increased risk to be hypertensive<sup>15</sup>. The variant of R279Q SNP (rs17576) that cause changes the amino acid Glutamine (Q) to Arginine (R) was associated with decreased risk of stroke in hypertensive patients<sup>16</sup>. Finally, GenHAT Study identified that the missense Q668R SNP (rs17577), that changes an Arginine to a Glutamine predicted coronary heart disease in hypertensive patients treated with Amlodipine from a panel of 78 candidate genetic variants<sup>17</sup>.

Large studies have investigated the association of genetic polymorphisms with hypertension<sup>18-19</sup>. However, studies on the role of genetic factors in RHTN is scarce<sup>8,20</sup>. This study aimed to evaluate whether the polymorphisms in MMP-9 gene (-1562C>T (rs3918242), R279Q (rs17576) and Q668R (rs17577) were associated with resistant hypertension among hypertensive subjects and, secondarily, the association of these polymorphisms with MMP-9 levels, blood pressure, LVH and arterial stiffness (AS).

### ***Study Population***

A total of 124 resistant hypertensive and 136 mild to moderate hypertensive patients (HTN) were included in this study. The diagnosis of resistant hypertension (RHTN) was performed according to the 2008 AHA Scientific Statement<sup>21</sup>. RHTN is defined as blood pressure (BP) that remains above goals despite of the concurrent use of

3 antihypertensive agents of different classes, including a diuretic, at optimal dose amounts. Also, patients whose blood pressure are controlled but require 4 or more medications are considered resistant <sup>21</sup>. HTN patients were individuals with hypertension being treated with <3 antihypertensive medications. Proper office BP measurement technique and Ambulatory BP monitoring (ABPM) were performed to confirm persistently elevated BP levels. We performed physical examination, complete medical history inquiry, electrocardiogram and laboratory testing in all individuals. Exclusion criteria included secondary hypertension (identifiable and removable causes of hypertension, including Conn's or Cushing's syndrome, renal artery stenosis, pheochromocytoma and coarctation of the aorta), liver and renal disease, heart failure (ejection fraction < 50%, by echocardiography), peripheral vascular disease and pregnancy. Hypertensive patients were underwent antihypertensive therapy optimization and evaluated for adherence to treatment by questionnaire <sup>22</sup>. The patients gave the written informed consent form before enrolling in the study approved by Research Ethics Committee at the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Sao Paulo, Brazil (approval no. 188.161/2013) and the procedures were performed in accordance in accordance with the Declaration of Helsinki.

### ***Genotyping***

Blood samples were collected into tubes containing EDTA after a fasting time of 8 hours. Genomic DNA was extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Genotypes for the -1562C>T polymorphism (rs3918242) were determined by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). A 435-bp fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) amplification using the primers 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-3' (sense) and 5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3' (antisense). The amplified products were digested with *SphI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) overnight at 37 °C, producing fragments of 247 and 188 bp whether the polymorphic variant (allele T) was present, or an undigested 435-bp band for the wild-type allele (allele C). Fragments were separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gels and visualized by silver staining. The call rate for -1562C>T polymorphism was 97%.

Genotypes for the R279Q (rs17576) and Q668R (rs17577) were determined using the TaqMan allelic discrimination assay, C\_11655953\_10 and C\_11655948\_1 respectively (Applied Biosystems, Foster City, CA). Fluorescence signals were detected

using StepOnePlus (Applied Biosystems) and analyzed with manufacturer's software. The PCR parameters were: one step of 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of DNA denaturation at 92°C for 15 seconds, and annealing/extension at 60°C for 1 minute.

### *Echocardiography*

Left ventricular (LV) dimensions were evaluated according to the American Society of Echocardiography recommendations using cardiovascular ultrasound machine (Siemens Acuson CV70, Munich, Bavaria, Germany) with multi-frequency sector transducer (2-4MHz)<sup>23</sup>. Deveraux formula was used to estimate LV mass. Left ventricular mass index (LVMI) was calculated by dividing the LV mass by the body surface area. Left ventricular hypertrophy was defined by LVMI above 95g/m<sup>2</sup> for women and 115g/m<sup>2</sup> for men<sup>24</sup>.

### *Arterial Stiffness*

Pulse wave velocity (PWV) is the "gold standard" method to evaluate arterial stiffness. PWV was measured using the SphygmoCor System (Atcor Medical, Sydney, Australia) with the patient in the supine position. Pulse wave of the carotid and femoral arteries were analyzed estimating the delay with respect to the ECG wave. Carotid-femoral PWV was calculated by dividing traveled distance by transit time (PWV = distance/time). The cut-off value of 10 m/s is considered to increased risk for cardiovascular events<sup>25</sup>.

### *Biochemical measurements*

Heparin-anticoagulated blood samples were collected during the morning after overnight fasting. The blood samples were immediately centrifuged at 2,000 x g for 10 min and plasma fractions were stored at -80°C until used for biochemical measurements. Plasma levels of MMP-9 and TIMP-1 were determined by ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) according to manufacturer's instructions. In addition, serum cholesterol, fasting glucose, LDL, HDL, triglycerides, HbA1C, aldosterone, creatinine and reactive C protein (CRP) were measured.

### *Statistical analysis*

Differences in genotypes and allele distributions were assessed using Chi square test (GraphPad Prism 5.00 (San Diego California, USA). For -1562 C>T, we combined both TT and CT genotypes together (CT+TT group) and compared with the CC genotype group. The distribution of genotypes for each polymorphism was assessed for deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium. Haplotypes frequencies were inferred using the Bayesian statistical-based program PHASE (version 2.1; <http://www.http://stephenslab.uchicago.edu>)<sup>26</sup>. The possible haplotypes including the three MMP-9 polymorphisms ordered according to their location in the chromosome [-1562C>T (rs3918242), R279Q (rs17576) and Q668R (rs17577)] were: H1(CAG), H2 (CGG), H3 (TGA), H4 (CGA), H5 (TAG), H6 (CAA), H7 (TAA) and H8 (TGG). Only haplotypes with frequencies greater than 1% were taken into consideration for statistical analyses<sup>27</sup>.

The statistical power was estimated using Quanto software (version 1.2.4, <http://biostats.usc.edu/Quanto.html>). Power was calculated to detect associations between the phenotypes and polymorphisms. We had 69.8% , 89.0% and 76.7% power using an additive model, two-sided, to detect an OR of 1.80 for RHTN, at P=0.05 and minor allele frequencies of 0.15, 0.46 and 0.19 for rs3918242, rs17576 and 17577, respectively. Two-tailed P values less than 0.05 were regarded as significant for clinical features between HTN and RHTN. We used the dominant genetic model to test the association of these polymorphisms with MMP-9 levels and clinical features for all three polymorphisms (gathering minor homozygote group with heterozygote group as minor allele carriers). Values of  $p < 0.016$  ( $0.05/3$  SNPs) were considered significant to correct for the number of comparisons made in genetic analysis (Bonferroni's correction).

## *Results*

General characteristics are summarized in table 1. The RHTN group had higher office SBP, BMI and higher prevalence of LVH. Significant differences were found in age, MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1 ratio, PWV, fasting glucose, HbA1C and triglycerides between the groups.

Alleles, genotypes and haplotypes distributions are shown in Table 2. The distribution of genotypes for each polymorphism showed no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Similar genotypes, alleles or haplotypes distributions were found between the RHTN and HTN patients.

Clinical and laboratorial characteristics of hypertensive groups were compared according to genotypes (table 3) and haplotypes (table 4). We found a significant association between diastolic blood pressure and R279Q polymorphism in RHTN group. G carrier subjects presented lower DBP compared with AA subjects (table 3). However, no association was found when age, race, BMI and presence of diabetes were taken in account in the multivariate analysis (table 5). We also evaluated the influence of haplotype containing G allele from R279Q in BP, but no association was found (table 5). In addition, no differences were found in PWV and LVH among the genotypes and haplotypes in both groups.

Finally, we combined both groups (HTN + RHTN) and MMP-9, TIMP-1, SBP, DBP, LVMI and PWV were compared between the genotypes for each SNP but no associations were found (Supplementary Table 2).

**Table 1: General characteristics of study groups**

	<b>HTN (n=136)</b>	<b>RHTN (n=124)</b>	<b>p- value</b>
Age (years)	65 ± 10	60 ± 11	<0.001*
Gender (female/male)	86/50	84/40	0.51
Ethnicity (% Non white )	13	44	<0.001*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.6 [24.6-37.8]	31.2 [26.9-34.9]	<0.001*
Office SBP (mmHg)	139 [131-148]	147 [134-160]	<0.001*
Office DBP (mmHg)	81 [76-86]	82 [78-92]	0.11
Heart rate (bpm)	67 [61-76]	66 [58-74]	0.25
ABPM SBP (mmHg)	127 [118-135]	130 [118-143]	0.16
ABPM DBP (mmHg)	76 [70-81]	76 [70-85]	0.36
LVMI (g/m <sup>2</sup> )	96 [86.4-117] (n=116)	115 [93-141] (n=79)	<0.001*
LVH (%)	22	61	<0.001*
PWV (m/s)	9.8 [8.6-11.6]	9.0 [7.6-11.1]	0.02*
MMP-9 (pg/mL)	38.5 [26.2-67.8]	26.1 [20.1-46.9]	<0.001*
TIMP-1	79.5 [67.9-100.6]	88.7 [74.9-109.8]	0.007*
MMP-9/TIMP-1	0.53 [0.33-0.85]	0.29[0.20-0.55]	<0.001*
Fasting Glucose (mg/dL)	97 [90-107]	104 [91.0-137.5]	0.01*
HbA1C (%)	5.7 [5.1-6.0]	6.3 [5.9-7.8]	0.004*
Total cholesterol (mg/dL)	165.0 [140.3-165]	181 [151-208]	0.002*
LDL (mg/dL)	86.5 [66.3-106.8]	98 [78.5-126.3]	0.002*
HDL (mg/dL)	49.0 [41.5-57]	46.0 [38-54.0]	0.04*
Triglycerides	108.0 [80.0-151.0]	128.0 [93.5-185]	0.02*
K (mEq/L)	4.3[4.1-4.6]	4.4 [4.2-4.7]	0.22
hs-CRP (mg/L)	2.8 [1.2-5.9]	3.1 [1.5-5.9]	0.39
Creatinine (mg/dL)	0.94 [0.79-1.21]	0.81 [0.52-0.96]	0.56

HTN: mild to moderate hypertensive; RHTN: resistant hypertensive patients; BMI: body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; LVMI: left ventricular mass index; LVH: left ventricular hypertrophy; HbA1C, glycated hemoglobin; ACEi, angiotensin I-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; CCB, calcium channel blocker. Data expressed as median [IQR]. \*p<0.05

**Table 2. Genotypes, alleles and haplotypes frequencies of MMP-9 polymorphisms - 1562 C>T, Q279R, and A668G in resistant hypertensive and mild to moderate hypertensive patients**

	HTN n=136 (%)	RHTN n=124 (%)	<i>p</i> Value	Odds Ratio	95% confidence interval
<u>Genotypes</u>					
<b>-1562 C&gt;T (rs3918242)</b>	<b>n=132</b>				
CC	84	89	-	-	(reference)
T carriers	16	11	0.37	0.67	0.33 to 1.39
HWE-p	0.93	0.39	-	-	-
<b>Q279R ((rs17576)</b>					
AA	42	44	-	1.00	(reference)
AG	44	48	0.79	1.07	0.64 to 1.80
GG	14	08	0.26	0.62	0.27 to 1.43
HWE-p	0.52	0.36	-	-	-
<b>A668G (rs17577)</b>					
GG	76	77	-	-	(reference)
AG	23	21	0.95	0.98	0.54 to 1.78
AA	01	02	0.93	1.09	0.15 to 7.92
HWE-p	0.99	0.87	-	-	-
<u>Alleles</u>					
<b>-1562C&gt;T (rs3918242)</b>					
C	92	94			(reference)
T	08	06	0.32	0.71	0.32 to 1.26
<b>R279Q (rs17576)</b>					
A	64	67			(reference)
G	36	33	0.52	0.87	0.61 to 1.26
<b>Q668R (rs17577)</b>					
G	87	88	0.89	0.97	(reference)
A	13	12			0.59 to 1.69
<u>Haplotypes:</u>					
<b>-1562C&gt;T; R279Q; Q668R</b>					
H1 (C-A-G)	63.97	66.13	0.44		
H2 (C-G-G)	23.53	20.97			
H3 (T-G-A)	7.72	5.24			-
H4 (C-G-A)	4.41	6.45			
H5 (T-A-G)	0.37	0.81		-	
H6 (C-A-A)	0	0.4		-	

HTN: mild to moderate hypertensive; RHTN: resistant hypertensive patients; G: guanine; T: thymine; C: cytosine; A: adenosine. HWE-p: Hardy-Weinberg p value;  $\chi^2$  test were used to compare groups distributions. H5 and H6 were not included in the analysis. \* $p < 0.016$  (0.05/number of snps) to correct for the number of comparisons made (Bonferroni's correction).

Table 3. Clinical characteristics of the hypertensive groups according to MMP-9 genotypes

	HAS (N=136)									
	-1562C>T (rs3918242)		R279Q (rs17576)			Q668R (rs17577)				
	CC	T carriers	p Value	AA	G carriers	p Value	GG	A carriers	p Value	
Age (years)	66 [57-73]	67 [58-71]	0.935	67 [58-72]	65 [57-72]	0.444	66 [58-73]	67 [56-71]	0.726	
Gender (F/M)	71/40	11/10	0.335	37/21	49/29	0.907	72/33	14/17	0.017	
MMP-9 (pg/mL)	40 [26.2-68.5]	37.1 [25-65.1]	0.761	36.5 [25.6-69.1]	40.2 [27.13-66.5]	0.642	40 [26.2-65.5]	37.5 [26.2-68.7]	0.793	
TIMP-1 (pg/mL)	77.6 [66.9-99.2]	90.9 [79.2-111.3]	0.054	77.1 [66.7-101.1]	79.9 [68.1-99.6]	0.395	78.2 [67.2-97.1]	90.0 [74-105.1]	0.094	
MMP/TIMP	0.54 [0.33-0.85]	0.38 [0.27-0.72]	0.145	0.47 [0.33-0.85]	0.54 [0.32-0.85]	0.938	0.54 [0.33-0.86]	0.44 [0.32-0.74]	0.544	
Non White n (%)	16(14)	2 (9)	0.739	7 (12)	12 (15)	0.802	17(16)	1(3)	0.073	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.7 [24.6-31.8]	28 [24.7-32.3]	0.842	27.5 [24.6-31.2]	27.9 [24.7-32]	0.408	27.6 [24.6-31.9]	27.8 [24.7-30.8]	0.855	
SBP (mmHg)	140 [132-148]	138 [127-149]	0.515	140 [133-149]	139 [130-148]	0.719	140 [132-148]	137 [128-147]	0.216	
DBP (mmHg)	82 [77-86]	80 [75-85]	0.396	81 [76-85]	82 [77-86]	0.537	82 [77-86]	80 [74-84]	0.122	
ABPM SBP (mmHg)	126 [118-134]	130 [118-139]	0.512	126 [118-134]	128 [118-135]	0.722	127 [118-135]	125 [118-135]	0.958	
ABPM DBP (mmHg)	76 [69-81]	76 [70-89]	0.558	75 [66-80]	77 [71-83]	0.099	76 [69-81]	75 [69-86]	0.889	
LVMI (g/m <sup>2</sup> )	100 [88-119]	102 [81-125]	0.858	99 [89-113]	100 [84-120]	0.953	98 [87-114]	104 [84-131]	0.408	
PWV (m/s)	9.9 [8.6-11.6]	9.7 [8.2-12.3]	0.879	10.7 [8.6-12.1]	9.4 [8.4-11.2]	0.050	9.3 [8.2-11.3]	10.1 [8.6-11.7]	0.39	
RHTN (N=124)										
	-1562C>T (rs3918242)		R279Q (rs17576)			Q668R (rs17577)				
	CC	T carriers	p Value	AA	G carriers	p Value	GG	A carriers	p Value	
	CC	T carriers	p Value	AA	G carriers	p Value	GG	A carriers	p Value	
Age (years)	60 [52-66]	60 [50-74]	0.836	60 [52-66]	61 [54-68]	0.797	60 [52-60]	57 [50-65]	0.382	
Gender (F/M)	74/36	10/4	0.754	35/19	49/21	0.566	65/31	19/9	0.988	
MMP-9 (pg/mL)	23.1 [18.9-45.4]	30.2 [25.1-57.4]	0.111	22.8 [18.6-56.2]	26.7 [20.6-45.2]	0.391	22.6 [18.9-44.4]	30.2 [22.9-53.4]	0.076	
TIMP-1	89.2 [77.7-109.3]	88.6 [65.6-114.3]	0.738	88.7 [76.9-105.5]	89.8 [74.6-116.1]	0.583	93.3 [80.1-112.1]	83.3 [67.4-93.8]	0.072	
MMP/TIMP	0.27 [0.2-0.54]	0.37 [0.27-0.66]	0.154	0.27 [0.21-0.5604]	0.29 [0.20-0.53]	0.834	0.27 [0.20-0.52]	0.37 [0.27-0.64]	0.061	
Non White n (%)	52(47)	3(21)	0.088	30 (55)	25 (36)	0.030	40 (42)	15 (54)	0.287	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31.9 [26.9-34.9]	31.2 [26.3-34.8]	0.749	31.2 [26.7-34.7]	30.8 [26.8-34.9]	0.794	31.2 [27-35.7]	30.1 [26.2-34.2]	0.383	
SBP (mmHg)	148 [136-161]	138 [134-164]	0.613	149 [136-165]	145 [134-165]	0.381	148 [135-162]	145 [134-156]	0.613	
DBP (mmHg)	82 [77-99]	84 [77-91]	0.848	85 [80-95]	81 [74.5-95.3]	0.013*	82 [75-92]	84 [80-88]	0.848	
ABPM SBP (mmHg)	128 [116-141]	130 [123-136]	0.697	129 [119-141]	128 [115-139]	0.711	127 [118-135]	127 [118-135]	0.968	
ABPM DBP (mmHg)	74 [68-83]	79 [71-87]	0.497	76 [72-84]	74 [65-82]	0.265	76 [70-81]	75 [69-86]	0.765	
LVMI (g/m <sup>2</sup> )	116 [94-143]	114 [96-127]	0.608	122 [95-142]	115 [91-142]	0.721	117 [97-142]	109 [82-143]	0.608	
PWV (m/s)	9.0 [7.5-11.0]	9.4 [7.9-11.5]	0.803	8.6 [7.4-10.4]	9.8 [7.8-12]	0.049	9.1 [7.5-11.1]	8.0 [7.6-11.4]	0.049	

HITN: mild to moderate hypertensive; RHTN: resistant hypertensive patients; BMI: body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; LVMI: left ventricular mass index; LVH: left ventricular hypertrophy; HbA1C, glycated hemoglobin; Data expressed as median [IQR]. \*p<0.016

**Table 4. Clinical characteristics of hypertensive subjects according to MMP-9 haplotypes (-1562C>T; R279Q; Q668R)**

	HTN (136)					RHTN (124)					p
	H1 (C-A-G)	H2 (C-G-G)	H3 (T-G-A)	H4 (C-G-A)	p	H1 (C-A-G)	H2 (C-G-G)	H3 (T-G-A)	H4 (C-G-A)		
SBP (mmHg)	139 [133-148]	142 [130-148]	138 [128-149]	137 [130-145]	0.78	148.0 [134-161]	147 [134-160.8]	144 [134-189]	145 [135-157]	0.97	
DBP (mmHg)	81 [77-85]	82 [78-88]	80 [74.5-85]	80 [75-83]	0.54	83.00 [79-93]	80 [73-89.5]	88 [80-98]	82 [79-88]	0.08	
LVMi (g/m <sup>2</sup> )	101 [88.4-119]	96 [85-119]	104 [85-125]	104 [84.2-131]	0.23	115.0 [93-142]	110 [84-135]	116 [89-127]	111 [83-144]	0.46	
PWV (m/s)	10.5 [8.6-11.8]	9.6 [8.7-11.3]	9.8 [7.9-12.3]	8.9 [8.15-9.4]	0.73	8.750 [7.5-10.9]	9.9 [7.7-12]	9.1 [7.8-11.5]	10.3 [7.8-11.9]	0.39	
MMP-9 (pg/mL)	37.6 [24.4-65.5]	45.4 [27.4-66.6]	37.1 [25-65.1]	60.6 [31.3-98.9]	0.35	26.1 [20.1-50.2]	24.3 [20.1-33.8]	33.2 [25.1-83.2]	26.6 [22.6-55.2]	0.30	
TIMP-1 (pg/mL)	78.2 [67.4-101.5]	81.3 [67.9-99.2]	94.1 [79.2-124.2]	75.3 [70.5-102.3]	0.17	88.7 [75-105.2]	96 [83.3-123.4]	84.5 [59.7-106]	78.4 [62.4-87.2]	0.02	
MMP-9/TIMP-1	0.49 [0.32-0.85]	0.56 [0.32-0.87]	0.38 [0.25-0.72]	0.75 [0.41-1.44]	0.15	0.30 [0.21-0.56]	0.27 [0.2-0.44]	0.37 [0.27-0.94]	0.44 [0.24-0.68]	0.08	

HTN: mild to moderate hypertensive; RHTN: resistant hypertensive patients; BMI: body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; LVMi: left ventricular mass index; LVH: left ventricular hypertrophy. Data expressed as median [IQR]. \*p<0.0125.

**Table 5. Multivariate linear regression analyses to explore the association of G allele of R279Q polymorphism and haplotypes containing G allele with DBP in resistant hypertensive group**

RHTN (n=124)	$\beta$	SEM	p value
R279Q (G carriers)	0.06	0.28	0.829
H2 (C-G-G)	-4.0	2.35	0.09
H3 (T-G-A)	-0.74	3.00	0.81
H4 (C-G-A)	-2.51	4.18	0.55

The four independent analyses were adjusted for age, BMI, presence of type II diabetes and race. RHTN: resistant hypertensive patients; BMI: body mass index; DBP, diastolic blood pressure; H2 (C-G-G): haplotype composed by -1562C>T; R279Q and Q668R polymorphism. G: guanine and C: cytosine.

## Discussion

In this study, we demonstrated that the MMP-9 polymorphisms (-1562C>T, R279Q and Q668R) were not associated with resistant hypertension. We also showed that alleles, genotypes and haplotypes for these polymorphisms did not affect MMP-9 levels nor left ventricular hypertrophy and arterial stiffness in hypertensive patients. RHTN subjects who carried G allele of Q668R polymorphism presented higher DBP than AA subjects, however the association were lack in a multivariate analysis.

Resistant hypertension is a multifactorial disease and among the factors associated with this condition is higher prevalence of TOD including LVH, microalbuminuria and arterial stiffness<sup>4, 6, 28</sup>. Obesity, diabetes, black race, aging and aldosterone levels are also related to RHTN<sup>6, 29</sup>. However, the genetic factors associated with this condition have been underexplored. GenHAT study showed that two variants in the angiotensin gene are related to RHTN in white subjects<sup>30</sup>. Some other studies also explored the association of renin-angiotensin-aldosterone system genes with resistant hypertension<sup>31-34</sup>. Data from INVEST genes showed that the variant of *ATP2B1* gene is associated with increased risk for RHTN<sup>20</sup>. Finally, other studies demonstrated association between genetic variants with BP response<sup>35-38</sup> and prevalence of TOD<sup>8</sup> in RHTN.

The high cardiovascular risk of RHTN<sup>39</sup> is due to poor BP control and high prevalence of target organ damage<sup>4, 28</sup>. Deregulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors participate in the hypertension-induced cardiovascular remodeling<sup>10-11</sup>. Hypertensive patients or animal models of hypertension had higher levels of MMP-9 compared to controls<sup>40</sup>. In addition, MMP-9 and TIMP-1 levels were associated to increased cardiovascular risk<sup>41-42</sup>. We recently showed that MMP-9 and TIMP-1 levels were independently associated with RHTN and cardiac damage (data not published/paper submitted). Several MMP-9 gene variants have been associated with cardiovascular conditions including myocardial infarction<sup>13</sup>, stroke<sup>14</sup> and hypertension<sup>15-16</sup>. This is the first study to evaluate polymorphisms in MMP-9 gene in resistant hypertension. We found no differences in haplotype, genotype and allelic

frequencies of MMP-9 polymorphisms between RHTN and HTN patients. Some studies have suggested that the T allele of the -1562C>T polymorphism at the promoter region of MMP-9 gene is a marker of cardiovascular risk<sup>43-44</sup>. However, we found that T allele is not associated with resistant hypertension. Moreover, the results of studies on hypertension are conflicting. A meta-analysis suggested that the T allele of -1562C>T polymorphism is associated with presence of hypertension<sup>15</sup>. Accordingly, a case-control study suggested that the T allele is associated with isolated systolic hypertension<sup>45</sup>. But, other authors showed no association of -1562C>T and essential hypertension<sup>12, 46</sup>. Regarding Q668R polymorphism, AA subjects (RR) treated with amlodipine versus chlorthalidone had higher risk of the clinical outcomes, but no effect was found when all treatments were combined<sup>16</sup>. Similarly, another study from GenHAT population showed that AA subjects presented higher risk of coronary heart disease in the amlodipine group<sup>17</sup>. Although our aim was not to evaluate clinical outcomes, we might expect different frequencies of this genotype variant between RHTN which represents high risk hypertensive group compared to HTN. However, additional factors may overcome the genetic effect of Q668R polymorphism in RHTN population.

Among the three MMP-9 polymorphisms evaluated in this study (-1562C>T, R279Q and Q668R), RHTN subjects who carried G allele of the R279Q polymorphism presented lower DBP. However, the association between R279Q polymorphism and DBP did not remain significant after adjustment for potential confounders (age, race, diabetes and BMI). R279Q polymorphism was not associated with the risk of hypertension<sup>12</sup>. On the other hand, previous study showed that patients with stable angina carrying the 279Q allele (A) had higher risk than patients homozygous for the 279R (G) allele<sup>43</sup>. A large study including GenHART hypertensive participants showed that G carriers (279R allele) presented modest lower risk of stroke in the whole sample. Lower risk of combined CVD in GG subjects was observed when patients received chlorthalidone versus amlodipine or lisinopril compared with participants with at least one copy of the A allele<sup>16</sup>. In our study, due to low sample size we do not have statistical power to analyze the effect of anti-hypertensive drugs on DBP according to the genotype.

In additional analysis we found no effect of MMP-9 polymorphisms in PWV and LHV, neither when the groups were combined. The relationship between -1562C>T with PWV was suggested to be sex specific in a cohort from an atherosclerosis study, where only 30% of sample was hypertensive<sup>47</sup>. T carrier patients with coronary artery disease presented higher arterial stiffness than CC homozygote<sup>48</sup>. Similarly, BP, aortic PWV and serum MMP-9 levels were significantly higher in T-allele carriers in never treated hypertensive<sup>49</sup>. The lack of association in our study might be due the long term hypertension and an installed vascular damage. Surprisingly, HTN subjects had higher PWV than RHTN group which can be explained by higher age in this group. It is well know that age is one of the main determinants of AS. Previous study showed that RHTN presented higher PWV in age-matched subjects<sup>6,28</sup>.

RHTN patients presented higher LVMI and increased prevalence of LVH, but no association was found with MMP-9 genotypes. Interestingly, a study reported that the MMP-9 haplotype "T, H, Q" (-1562C>T (rs3918242), -90 (CA)14-24(rs2234681) and R279Q (rs17576) was associated with LVMI, suggesting that the haplotype apparently has detrimental effects over echocardiography parameters in hypertensive patients<sup>12</sup>. They also demonstrated that the -90(CA)14-24 polymorphism is related to hypertension, but not -1562C>T and R279Q. Indeed, we found representation of six haplotypes in our study groups with similar distributions in HTN and RHTN subjects. MMP-9 haplotypes did not affect BP or prevalence of LVH and arterial stiffness in this study.

Secondarily, we evaluated whether MMP-9 polymorphisms affect its levels. We did not find differences in MMP-9 levels according to the genotype in both hypertensive groups, even when HTN and RHTN were combined. Similarly, other authors did not find association of -1562C>T and MMP-9 levels and activity in healthy volunteers<sup>50-52</sup> and patients with hypertensive disorders of pregnancy<sup>53</sup>. On the other hand, T allele of -1562C>T was significantly associated with MMP-9 levels in metabolic syndrome<sup>54</sup>, obese children<sup>55</sup> and coronary artery disease (CAD)<sup>56</sup>. Previous study described that polymorphisms -1562C>T and Q668R, which were in linkage disequilibrium, affected MMP-9 levels in Taiwanese individuals<sup>57</sup>. The same authors also described other factors which interfered in MMP-9 concentrations, including age, glucose and C reactive protein. As these characteristics are inherent of hypertensive patients<sup>6</sup>, our population was mainly elderly, had high levels of CRP ( $\leq 2.0$  mg/L) and high fasting glucose. Thus, together with the eventual interference of multiple antihypertensive drugs, we consider the possibility of these factors may overcome the genetic effect of the polymorphisms in MMP-9 levels.

drugs, we consider the possibility of these factors may overcome the genetic effect of the polymorphisms in MMP-9 levels.

The present study presents some limitations: (1) we studied a relatively small number of subjects and in spite we had statistical power to our primary aim, larger sample size would be required to detect small effect size; (2) our patients were taken multiple anti-hypertensive drugs which may have masked the genetic influence of MMP-9 polymorphisms on MMP-9 levels and (3) our case-control study was not age-matched.

In conclusion, genetic polymorphisms in MMP-9 gene are not associated neither to the phenotype of RHTN, nor the prevalence of left ventricular hypertrophy and arterial stiffness in these subjects. Finally, MMP-9 polymorphisms did not affect MMP-9 levels in mild to moderate and resistant hypertensive subjects.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (Capes), Brazil.

#### References

1. Irvin MR, Booth JN, 3rd, Shimbo D, Lackland DT, Oparil S, Howard G, et al. Apparent treatment-resistant hypertension and risk for stroke, coronary heart disease, and all-cause mortality. *J Am Soc Hypertens*. 2014 Jun;8(6):405-13.
2. Sim JJ, Bhandari SK, Shi J, Liu IL, Calhoun DA, McGlynn EA, et al. Characteristics of resistant hypertension in a large, ethnically diverse hypertension population of an integrated health system. *Mayo Clin Proc*. 2013 Oct;88(10):1099-107.
3. Thomas G, Xie D, Chen HY, Anderson AH, Appel LJ, Bodana S, et al. Prevalence and Prognostic Significance of Apparent Treatment Resistant Hypertension in Chronic Kidney Disease: Report From the Chronic Renal Insufficiency Cohort Study. *Hypertension*. 2016 Feb;67(2):387-96.
4. Cuspidi C, Macca G, Sampieri L, Michev I, Salerno M, Fusi V, et al. High prevalence of cardiac and extracardiac target organ damage in refractory hypertension. *J Hypertens*. 2001 Nov;19(11):2063-70.
5. Judd E, Calhoun DA. Obesity, African American Race, Chronic Kidney Disease, and Resistant Hypertension: The Step Beyond Observed Risk. *Hypertension*. 2016 Feb;67(2):275-7.
6. Martins LC, Figueiredo VN, Quinaglia T, Boer-Martins L, Yugar-Toledo JC, Martin JF, et al. Characteristics of resistant hypertension: ageing, body mass index, hyperaldosteronism, cardiac hypertrophy and vascular stiffness. *J Hum Hypertens*. 2011 Sep;25(9):532-8.
7. El Rouby N, Cooper-DeHoff RM. Genetics of resistant hypertension: a novel pharmacogenomics phenotype. *Curr Hypertens Rep*. 2015 Sep;17(9):583.
8. Ritter AM, Fontana V, de Faria AP, Modolo R, Barbaro NR, Sabbatini AR, et al. Association of Mineralocorticoid Receptor Polymorphism I180V With Left Ventricular Hypertrophy in Resistant Hypertension. *Am J Hypertens*. 2016 Feb;29(2):245-50.
9. Fontana V, Luizon MR, Sandrim VC. An update on the pharmacogenetics of treating hypertension. *J Hum Hypertens*. 2015 May;29(5):283-91.
10. Azevedo A, Prado AF, Antonio RC, Issa JP, Gerlach RF. Matrix metalloproteinases are involved in cardiovascular diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014 Oct;115(4):301-14.

11. Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta*. 2012 Apr 11;413(7-8):656-62.
12. Lacchini R, Jacob-Ferreira AL, Luizon MR, Coeli FB, Izidoro-Toledo TC, Gasparini S, et al. Matrix metalloproteinase 9 gene haplotypes affect left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Clin Chim Acta*. 2010 Dec 14;411(23-24):1940-4.
13. Juan Z, Wei-Guo Z, Heng-Liang S, Da-Guo W. Association of Matrix Metalloproteinase 9 C-1562T Polymorphism with Genetic Susceptibility to Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2015 Dec;77:40-5.
14. Buraczynska K, Kurzepa J, Ksiazek A, Buraczynska M, Rejdak K. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Gene Polymorphism in Stroke Patients. *Neuromolecular Med*. 2015 Dec;17(4):385-90.
15. Yang W, Lu J, Yang L, Zhang J. Association of Matrix Metalloproteinase-9 Gene - 1562C/T Polymorphism with Essential Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis Article. *Iran J Public Health*. 2015 Nov;44(11):1445-52.
16. Tanner RM, Lynch AI, Brophy VH, Eckfeldt JH, Davis BR, Ford CE, et al. Pharmacogenetic associations of MMP9 and MMP12 variants with cardiovascular disease in patients with hypertension. *PLoS One*. 2011;6(8):e23609.
17. Lynch AI, Eckfeldt JH, Davis BR, Ford CE, Boerwinkle E, Leidencker-Foster C, et al. Gene panels to help identify subgroups at high and low risk of coronary heart disease among those randomized to antihypertensive treatment: the GenHAT study. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 May;22(5):355-66.
18. Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, Dehghan A, et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet*. 2009 Jun;41(6):677-87.
19. Ganesh SK, Tragante V, Guo W, Guo Y, Lanktree MB, Smith EN, et al. Loci influencing blood pressure identified using a cardiovascular gene-centric array. *Hum Mol Genet*. 2013 Apr 15;22(8):1663-78.
20. Fontana V, McDonough CW, Gong Y, El Rouby NM, Sa AC, Taylor KD, et al. Large-scale gene-centric analysis identifies polymorphisms for resistant hypertension. *J Am Heart Assoc*. 2014 Dec;3(6):e001398.
21. 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. *Hypertension*. 2008 Jun;51(6):1403-19.
22. de Souza WA, Yugar-Toledo JC, Bergsten-Mendes G, Sabha M, Moreno H, Jr. Effect of pharmaceutical care on blood pressure control and health-related quality of life in patients with resistant hypertension. *Am J Health Syst Pharm*. 2007 Sep 15;64(18):1955-61.
23. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. [Practice Guideline]. 2005 Dec;18(12):1440-63.
24. Cheitlin MD, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, Davis JL, et al. ACC/AHA/ASE 2003 Guideline Update for the Clinical Application of Echocardiography: summary article. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to Update the 1997 Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography). *J Am Soc Echocardiogr*. 2003 Oct;16(10):1091-110.

25. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens*. 2012 Mar;30(3):445-8.
26. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001 Apr;68(4):978-89.
27. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan 15;21(2):263-5.
28. Barbaro NR, Fontana V, Modolo R, De Faria AP, Sabbatini AR, Fonseca FH, et al. Increased arterial stiffness in resistant hypertension is associated with inflammatory biomarkers. *Blood Press*. 2014 Jul 25:1-7.
29. Gupta AK, Nasothimiou EG, Chang CL, Sever PS, Dahlof B, Poulter NR. Baseline predictors of resistant hypertension in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcome Trial (ASCOT): a risk score to identify those at high-risk. *J Hypertens*. 2011 Oct;29(10):2004-13.
30. Lynch AJ, Irvin MR, Davis BR, Ford CE, Eckfeldt JH, Arnett DK. Genetic and Adverse Health Outcome Associations with Treatment Resistant Hypertension in GenHAT. *Int J Hypertens*. 2013;2013:578578.
31. Fontana V, de Faria AP, Barbaro NR, Sabbatini AR, Modolo R, Lacchini R, et al. Modulation of aldosterone levels by -344 C/T CYP11B2 polymorphism and spironolactone use in resistant hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2014 Mar;8(3):146-51.
32. Lacchini R, Sabha M, Coeli FB, Favero FF, Yugar-Toledo J, Izidoro-Toledo TC, et al. T allele of -344 C/T polymorphism in aldosterone synthase gene is not associated with resistant hypertension. *Hypertens Res*. 2009 Feb;32(2):159-62.
33. 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.
34. Yugar-Toledo JC, Martin JF, Krieger JE, Pereira AC, Demacq C, Coelho OR, et al. Gene variation in resistant hypertension: multilocus analysis of the angiotensin 1-converting enzyme, angiotensinogen, and endothelial nitric oxide synthase genes. *DNA Cell Biol*. 2011 Aug;30(8):555-64.
35. Gong Y, McDonough CW, Beitelshees AL, El Rouby N, Hiltunen TP, O'Connell JR, et al. PTPRD gene associated with blood pressure response to atenolol and resistant hypertension. *J Hypertens*. 2015 Nov;33(11):2278-85.
36. Spinasse LB, Santos AR, Suffys PN, Muxfeldt ES, Salles GF. Different phenotypes of the NAT2 gene influences hydralazine antihypertensive response in patients with resistant hypertension. *Pharmacogenomics*. 2014 Feb;15(2):169-78.
37. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Coeli-Lacchini FB, Junior HM, Tanus-Santos JE. Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with hypertension and responsiveness to antihypertensive drug therapy. *Gene*. 2013 Feb 25;515(2):391-5.
38. Sandrim VC, Yugar-Toledo JC, Desta Z, Flockhart DA, Moreno H, Jr., Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are related to blood pressure elevation, but not to resistance to antihypertensive drug therapy. *J Hypertens*. 2006 Dec;24(12):2393-7.
39. Pierdomenico SD, Lapenna D, Bucci A, Di Tommaso R, Di Mascio R, Manente BM, et al. Cardiovascular outcome in treated hypertensive patients with responder, masked, false resistant, and true resistant hypertension. *Am J Hypertens*. 2005 Nov;18(11):1422-8.
40. Fontana V, Silva PS, Belo VA, Antonio RC, Ceron CS, Biagi C, et al. Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011 Aug;109(2):130-7.

40. Fontana V, Silva PS, Belo VA, Antonio RC, Ceron CS, Biagi C, et al. Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011 Aug;109(2):130-7.
41. Tayebjee MH, Nadar S, Blann AD, Gareth Beevers D, MacFadyen RJ, Lip GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens*. 2004 Sep;17(9):764-9.
42. Lubos E, Schnabel R, Rupprecht HJ, Bickel C, Messow CM, Prigge S, et al. Prognostic value of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 for cardiovascular death among patients with cardiovascular disease: results from the AtheroGene study. *Eur Heart J*. 2006 Jan;27(2):150-6.
43. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003 Apr 1;107(12):1579-85.
44. Jones GT, Phillips VL, Harris EL, Rossaak JI, van Rij AM. Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2003 Dec;38(6):1363-7.
45. Huang R, Deng L, Shen A, Liu J, Ren H, Xu DL. Associations of MMP1, 3, 9 and TIMP3 genes polymorphism with isolated systolic hypertension in Chinese Han population. *Int J Med Sci*. 2013;10(7):840-7.
46. Bayramoglu A, Kucuk M, Guler HI, Abaci O, Kucukkaya Y, Colak E. Is there any genetic predisposition of MMP-9 gene C1562T and MTHFR gene C677T polymorphisms with essential hypertension? *Cytotechnology*. 2015 Jan;67(1):115-22.
47. Lin RT, Chen CH, Tsai PC, Ho BL, Juo SH, Lin HF. Sex-specific effect of matrix metalloproteinase-9 functional promoter polymorphism on carotid artery stiffness. *Atherosclerosis*. 2012 Aug;223(2):416-20.
48. Yasmin, McEniery CM, O'Shaughnessy KM, Harnett P, Arshad A, Wallace S, et al. Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Aug;26(8):1799-805.
49. Zhou S, Feely J, Spiers JP, Mahmud A. Matrix metalloproteinase-9 polymorphism contributes to blood pressure and arterial stiffness in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2007 Nov;21(11):861-7.
50. Demacq C, de Souza AP, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase (MMP)-9 does not affect plasma MMP-9 activity in healthy subjects. *Clin Chim Acta*. 2006 Mar;365(1-2):183-7.
51. Metzger IF, Luizon MR, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Genetic variants in matrix metalloproteinase-9 gene modify metalloproteinase-9 levels in black subjects. *DNA Cell Biol*. 2012 Apr;31(4):504-10.
52. Demacq C, Vasconcellos VB, Marcaccini AM, Gerlach RF, Silva WA, Jr., Tanus-Santos JE. Functional polymorphisms in the promoter of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene are not linked with significant plasma MMP-9 variations in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(1):57-63.
53. Palei AC, Sandrim VC, Amaral LM, Machado JS, Cavalli RC, Lacchini R, et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms affect plasma MMP-9 levels and antihypertensive therapy responsiveness in hypertensive disorders of pregnancy. *Pharmacogenomics J*. 2012 Dec;12(6):489-98.

54. Yadav SS, Mandal RK, Singh MK, Verma A, Dwivedi P, Sethi R, et al. High serum level of matrix metalloproteinase 9 and promoter polymorphism - 1562 C:T as a new risk factor for metabolic syndrome. *DNA Cell Biol.* 2014 Nov;33(11):816-22.
55. Belo VA, Souza-Costa DC, Luizon MR, Lanna CM, Carneiro PC, Izidoro-Toledo TC, et al. Matrix metalloproteinase-9 genetic variations affect MMP-9 levels in obese children. *Int J Obes (Lond).* 2012 Jan;36(1):69-75.
56. Wu HD, Bai X, Chen DM, Cao HY, Qin L. Association of genetic polymorphisms in matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease in the Chinese Han population: a case-control study. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013 Sep;17(9):707-12.
57. Wu S, Hsu LA, Teng MS, Lin JF, Chang HH, Chang PY, et al. Association of matrix metalloproteinase 9 genotypes and cardiovascular disease risk factors with serum matrix metalloproteinase 9 concentrations in Taiwanese individuals. *Clin Chem Lab Med.* 2010 Apr;48(4):543-9.

### 4.3 Resultados adicionais

Os principais achados do artigo 1 (seção 4.1) revelaram as diferenças nas concentrações plasmáticas da MMP-9 e do TIMP-1 entre os grupos de HAR comparados ao grupo de pacientes não resistentes (HAS). Os níveis plasmáticos da MMP-9 e a razão MMP-9/TIMP-1 foram significativamente menores nos HAR, enquanto as concentrações de TIMP-1 foram superiores. Essas relações permaneceram significativas mesmo após ajuste para outras variáveis como raça, idade, presença de diabetes, PAS e IMC em análise de regressão logística. Além disso, análises de correlação nos permitiu verificar a relação entre o TIMP-1 e IMVE nos grupos de hipertensos. Dentre estas, apenas a relação negativa entre TIMP-1 e IMVE no grupo HAR foi significativa após ajuste em análise de regressão linear múltipla. Como resultados adicionais, agregamos ambos os grupos de hipertensos (HAS+HAR) e comparamos os biomarcadores em pacientes que possuíam HVE com os que não tinham HVE, os pacientes com hipertrofia tiveram menor relação MMP-9/TIMP-1 (figura 3).

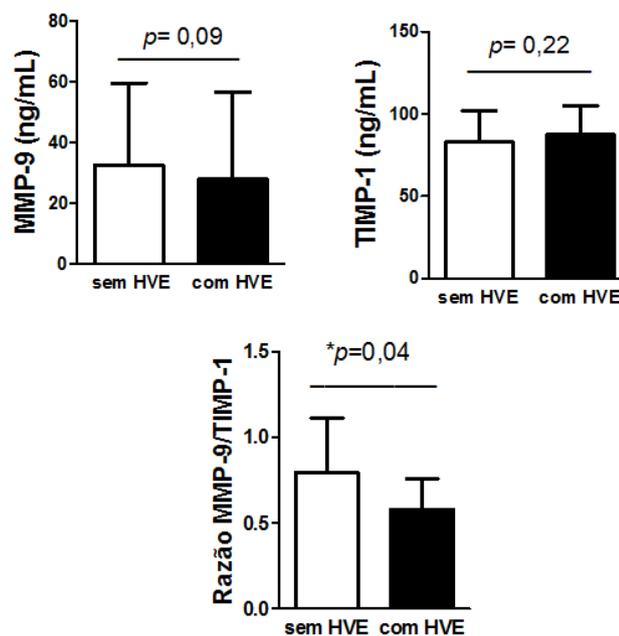


Figura 3: Níveis plasmáticos de MMP-9, TIMP-1 e relação MMP-9/TIMP-1 em pacientes com vs. sem hipertrofia ventricular esquerda (HVE)  $p < 0,05$ .

Em análises adicionais, nós avaliamos se esses biomarcadores e também a razão MMP-9/TIMP-1 estavam associados com outras variáveis clínicas como pressão arterial, VOP e IMVE. Para tal, correlações de Spearman foram realizadas e os resultados encontram-se na Tabela 1 desta seção. O TIMP-1 foi correlacionado positivamente com IMVE nos hipertensos leve e moderados e apresentou uma correlação negativa nos hipertensos resistentes. Não houve associação entre MMP-9, TIMP-1 e razão MMP-9/TIMP-1 com as variáveis clínicas PAS e VOP em nenhum dos grupos estudados, mesmo quando avaliados juntos.

**Tabela 1. Correlações de Spearman entre MMP-9, TIMP-1 e razão MMP-9/TIMP-1 com as variáveis clínicas nos grupos de hipertensos**

	<b>HAS (n=136)</b>					
	MMP-9 (ng/mL)		TIMP-1(ng/mL)		MMP-9/TIMP-1	
	R <sup>2</sup>	<i>p</i>	R <sup>2</sup>	<i>p</i>	R <sup>2</sup>	<i>p</i>
VOP (m/s)	-0,05	0,56	0,16	0,06	-0,13	0,13
IMVE (g/m <sup>2</sup> )	-0,02	0,85	0,20	0,03*	-0,14	0,11
PAS MAPA	0,14	0,16	0,03	0,76	0,05	0,58
PAD MAPA	0,001	0,99	0,77	0,22	0,03	0,74
	<b>HAR (n=124)</b>					
	MMP-9 (ng/mL)		TIMP-1(ng/mL)		MMP-9/TIMP-1	
	R <sup>2</sup>	<i>p</i>	R <sup>2</sup>	<i>p</i>	R <sup>2</sup>	<i>p</i>
VOP (m/s)	0,17	0,13	0,02	0,79	0,16	0,06
IMVE (g/m <sup>2</sup> )	-0,06	0,52	-0,32	0,005*	0,11	0,24
PAS MAPA	-0,08	0,46	0,04	0,69	-0,06	0,54
PAD MAPA	-0,08	0,43	0,01	0,94	-0,07	0,52
	<b>HAS + HAR (n=260)</b>					
	MMP-9 (ng/mL)		TIMP-1(ng/mL)		MMP-9/TIMP-1	
	R <sup>2</sup>	<i>p</i>	R <sup>2</sup>	<i>p</i>	R <sup>2</sup>	<i>p</i>
VOP (m/s)	0,09	0,16	0,05	0,45	0,14	0,11
IMVE (g/m <sup>2</sup> )	-0,09	0,15	0,07	0,28	-0,02	0,85
PAS MAPA	0,01	0,85	0,03	0,64	-0,03	0,68
PAD MAPA	-0,03	0,69	-0,07	0,36	0,68	0,91

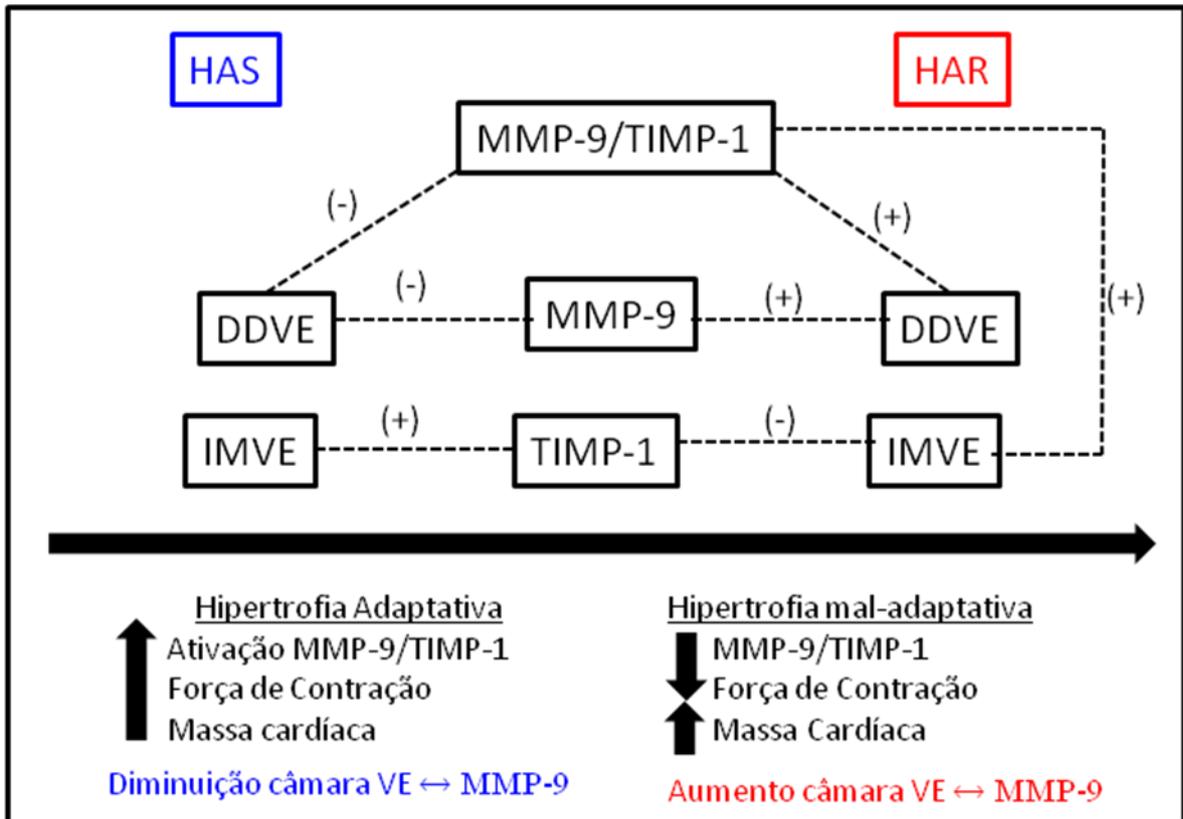
HAS: hipertensos não resistentes; HAR: hipertensos resistentes, PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; MAPA: Monitoração ambulatorial da pressão arterial; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo; \**p*<0,05

As concentrações de MMP-9 não foram associadas à IMVE em ambos os grupos de hipertensos. Entretanto, quando avaliamos a correlação da MMP-9 com os demais parâmetros ecocardiográficos, foi encontrada associação positiva entre MMP-9 e a espessura do septo intraventricular, parede posterior e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) (Tabela 2) no grupo HAR. Ainda os níveis de MMP-9 foram negativamente correlacionados com DDVE no grupo de HAS. Nas análises de correlação da razão MMP-9/TIMP-1 com os parâmetros ecocardiográficos, observamos correlação positiva com septo, parede posterior, massa do ventrículo esquerdo e DDVE no grupo HAR. Enquanto no grupo HAS apenas DDVE foi inversamente associado à razão MMP-9/TIMP-1. Apresentamos as principais correlações descritas na figura 4.

**Tabela 2. Correlações de Spearman entre MMP-9 e razão MMP-9/TIMP-1 e os parâmetros ecocardiográficos nos grupos de hipertensos**

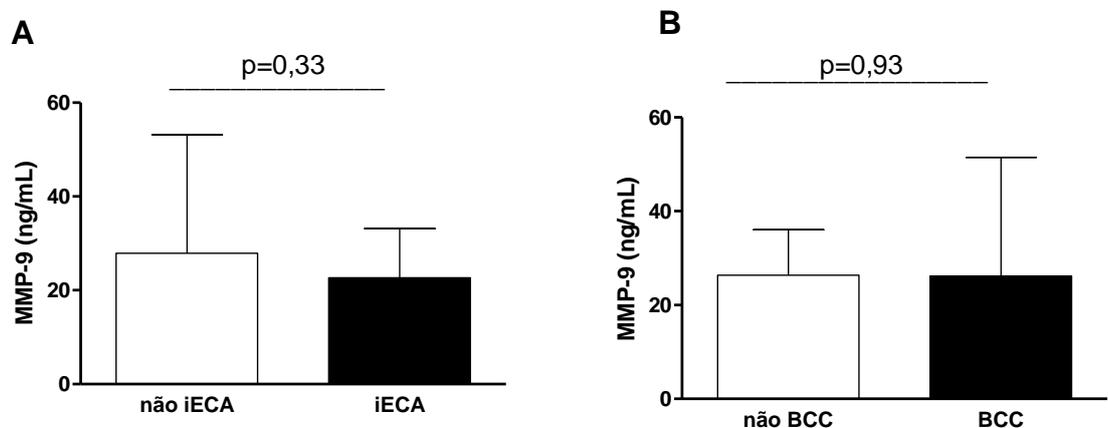
	HAS (n=116)		HAR (n=79)	
	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p
<b>MMP-9</b>				
Septo (mm)	0,18	0,06	0,26	0,03*
Parede Posterior (mm)	0,14	0,14	0,27	0,02*
MVE (g)	0,002	0,98	0,16	0,18
IMVE (g/m <sup>2</sup> )	-0,06	0,52	0,05	0,69
DDVE (mm)	-0,25	0,006*	0,24	0,04*
Átrio Esquerdo	-0,03	0,73	0,21	0,07
Fração de Ejeção (%)	0,03	0,79	-0,17	0,17
<b>MMP-9/TIMP-1</b>				
Septo (mm)	0,12	0,19	0,27	0,02*
Parede Posterior (mm)	0,09	0,29	0,34	0,003*
MVE (g)	-0,04	0,64	0,31	0,01*
IMVE (g/m <sup>2</sup> )	-0,13	0,15	0,26	0,02*
DDVE (mm)	-0,20	0,03*	0,28	0,01*
Átrio Esquerdo	-0,016	0,86	0,06	0,59
Fração de Ejeção (%)	0,06	0,51	-0,19	0,13

MVE: Massa do ventrículo esquerdo; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. HAS: hipertensos não resistentes; HAR: Hipertensos resistentes, \*p<0,05



**Figura 4: Esquema representativo dos principais resultados obtidos a partir da análise de correlação entre os parâmetros ecocardiográficos e os níveis de MMP-9 e TIMP-1 e razão MMP-9/TIMP-1.** Esse esquema representa as principais correlações significativas entre os níveis plasmáticos de MMP-9 e TIMP-1 com o IMVE (índice de massa do ventrículo esquerdo) e o DDVE (diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo). O objetivo foi reunir os nossos achados comparando-os com perfil fisiopatológico que ocorre durante o remodelamento cardíaco na hipertensão arterial sistêmica. As relações propostas são que na hipertrofia adaptativa, onde é necessário um remodelamento mais ativo para adaptar-se as mudanças na PA, a razão MMP-9/TIMP-1 é maior (grupo HAS). Nesta fase, ocorre aumento do massa cardíaco devido à hipertrofia dos cardiomiócitos e consequente diminuição da câmara ventricular. De acordo, em pacientes HAS, a relação MMP-9/TIMP-1 foi negativamente relacionada ao DDVE, indicando a relação da maior atividade da MMP-9 com a diminuição da câmara do VE, que é esperado na hipertrofia adaptativa. Com a progressão da doença hipertensiva (HAR), o sistema MMP-9/TIMP-1 seria suprimido. Assim, na hipertrofia mal-adaptativa, a relação positiva entre MMP-9/TIMP-1 e DDVE, sugere que nesta fase quanto maior atividade de MMP-9 maior o aumento da câmara ventricular, resultado de uma degradação excessiva da matriz extracelular. A correlação positiva está representada pelo símbolo (+) e a correlação negativa pelo símbolo (-). HAS: grupo de hipertensos não resistentes; HAR: hipertensos resistentes; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo.

Na tentativa de verificar o potencial efeito de fármacos anti-hipertensivos nos níveis plasmáticos da MMP-9 em pacientes hipertensos resistentes, realizamos uma análise de subgrupo utilizando duas abordagens. Primeiramente dividimos os pacientes HAR que estavam administrando inibidores enzima conversora de angiotensina (iECA) vs. os que não faziam utilização de iECA e comparamos os níveis de MMP-9. A mesma análise foi realizada para a utilização de bloqueadores de canais de cálcio (figura 5).



**Figura 5:** Comparação entre a concentração plasmática de MMP-9 entre pacientes hipertensos resistentes administrando A) iECA (inibidores da enzima conversora de angiotensina) comparados aos que não utilizam iECA (não iECA).; ou B) Bloqueadores do canal de cálcio (BCC) comparados aos que não utilizam BCC (não BCC). Dados expressos como mediana [IQ]. Teste de Mann-Whitney, \* $p < 0,05$

O artigo 2, na seção 4.2 reuniu os principais resultados nas avaliações dos polimorfismos genéticos da MMP-9 (-1562C>T, R279Q e Q668R) na hipertensão resistente. Não foram encontradas diferenças nas frequências alélicas e genotípicas entre os grupos. Os genótipos da MMP-9 também não interferiram nos níveis de MMP-9, na presença de HVE ou rigidez arterial em nenhum dos grupos, nem quando os grupos foram agrupados. Além disso, não houve diferenças nas características clínicas e nos níveis dos biomarcadores entre os genótipos, com exceção para os valores de PAD, que foram menores em hipertensos resistentes que eram portadores do alelo G em comparação aos homocigotos AA. Para verificar os possíveis interferentes para essa relação, realizamos análise de regressão adicionando as variáveis “idade, raça, presença de diabetes e IMC”; e a relação

entre a presença do alelo G com PAD não permaneceu significativa. Adicionalmente realizamos análises de regressão linear múltipla para avaliar a associação dos haplótipos que continham o alelo G do polimorfismo R279Q [H2 (C-G-G); H3 (T-G-A) e H4 (C-G-A)] com PAD no grupo de hipertensos resistentes e nenhum dos haplótipos foi associado à PAD.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

Os principais resultados deste estudo foram:

- 1- Pacientes hipertensos resistentes (HAR) possuíram menor concentração plasmática de MMP-9, maior nível de TIMP-1 e menor atividade global de MMP-9 representada pela relação MMP-9/TIMP-1 comparados aos hipertensos não resistentes;
- 2- MMP-9, TIMP-1 e razão MMP-9/TIMP-1 foram associados com a presença de HAR independente de idade, raça, IMC, PAS e presença de diabetes;
- 3- Os níveis de TIMP-1 foram positivamente associados com IMVE no grupo de hipertensos não resistentes (HAS) e inversamente correlacionados no grupo de HAR;
- 4- TIMP-1 foi independentemente associado à IMVE no grupo HAR, mas não no grupo HAS em análise ajustada;
- 5- As concentrações de MMP-9 foram positivamente associadas à espessura da parede posterior, septo e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) no grupo HAR. A correlação de MMP-9 com DDVE no grupo HAS foi negativa.
- 6- A relação MMP-9/TIMP-1 teve correlação positiva com DDVE no grupo de HAR e negativa no grupo HAS.
- 7- Não houve correlação entre MMP-9, TIMP-1 e MMP-9/TIMP-1 com VOP e PA em nenhum dos grupos;
- 8- As frequências genotípicas, alélicas e haplotípicas foram similares entre os grupos;
- 9- Os genótipos da MMP-9 não afetaram as concentrações plasmáticas de MMP-9, nem as lesões de órgãos-alvo avaliadas (hipertrofia do ventrículo esquerdo e rigidez arterial) ou pressão arterial nos grupos de hipertensos. Os haplótipos também não influenciaram essas características.

A MMP-9 e seu inibidor, TIMP-1, têm sido amplamente estudados no contexto de doenças cardiovasculares e hipertensão (66, 118). Apesar disso, ainda não há um consenso sobre fatores envolvidos em seu equilíbrio, ou a existência de relação causal na hipertensão. Enquanto alguns autores observaram níveis aumentados em hipertensos comparados com normotensos (83, 119-121), o oposto também foi descrito (84, 122, 123). Nosso estudo foi o primeiro a avaliar a MMP-9 e o TIMP-1 na hipertensão resistente em comparação com hipertensos não resistentes. Nós demonstramos que há menor atividade global da MMP-9 em hipertensos resistentes comparados ao grupo controle. O grupo de HAR apresentou menores concentrações de MMP-9 e maiores níveis de TIMP-1 em relação ao grupo HAS. Em estudo recente não foram encontradas diferenças nestes biomarcadores entre pacientes HAR com PA controlada ou não controlada (86), sugerindo que o controle pressórico não altera os níveis de MMP-9 e TIMP-1 na hipertensão resistente. Em estudos com animais, elevados níveis de MMP-9 foram observados no modelo de hipertensão SHR quando comparados aos controles (83). Outro estudo mostrou que a infusão de angiotensina em animais *knockout* para MMP-9 aumentou a PA significativamente em relação aos animais selvagens. Os autores atribuíram esse efeito à menor complacência da aorta e maior acúmulo de colágeno na ausência de MMP-9 (80). No presente estudo, não encontramos correlações entre os biomarcadores e pressão arterial, assim, na HAR outros fatores envolvidos em sua fisiopatologia como a hiperativação do sistema renina angiotensina, inflamação, hiperativação do sistema simpático, bem como as comorbidades associadas, como diabetes, obesidade e síndrome metabólica, podem ser fatores que influenciam o equilíbrio MMP-9/TIMP-1. Ainda, como níveis aumentados de TIMP-1 foram preditores de hipertensão (124) e morte cardiovascular em estudos prévios (125), pode-se sugerir que ambos biomarcadores devem refletir o remodelamento cardiovascular que acompanha a hipertensão, ao invés de um efeito direto da PA.

Em relação aos contrastes nos níveis de MMP-9 e TIMP-1 entre os estudos na hipertensão, as diferenças podem ser pela utilização de diferentes tipos de amostra (plasma ou soro) (126, 127), armazenamento ou uso de diferentes técnicas metodológicas (ELISA ou zimografia) (128). Porém, em meta-análise com pacientes hipertensos foram incluídos apenas estudos que utilizaram plasma, e mesmo assim

os valores de MMP-9 apresentaram grande variabilidade entre os estudos, os níveis de MMP-9 foram associados com hipertensão utilizando a média da razão de chance entre os estudos descritos (129). Outro fator importante é que a hipertensão trata-se de uma doença multifatorial com diversos sistemas fisiopatológicos envolvidos gerando diferenças entre as populações dos estudos de acordo com a seleção da amostra.

Algumas medicações anti-hipertensivas podem ter efeito nas concentrações ou atividade das MMPs. Apesar dos achados controversos na literatura, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) são potenciais inibidores da MMP-9. Isto se deve ao fato de que ambas MMP-9 e a ECA são endopeptidases dependentes de zinco e processam angiotensina I (130). Assim, estudos utilizando um modelo computacional para predição da interação entre a MMP-9 e inibidores da ECA (iECA), o lisinopril (131) e o captopril (132), mostraram que pode ocorrer ligação entre os compostos e o sítio ativo da MMP-9. Ensaios enzimáticos utilizando MMP-9 extraída de células mesangiais e incubadas com Captopril ou Lisinopril também demonstraram que ambos iECAs diminuíram a atividade de MMP-9 *in vitro* (133). No entanto, os níveis de MMP-9 e TIMP-1 não foram alterados pelo tratamento de pacientes hipertensos com enalapril em monoterapia, assim como não foi observado efeito inibitório do enalaprilato (metabolito ativo do enalapril) sobre a síntese de MMP-9 em células endoteliais em cultura nem em ensaio bioquímico *in vitro* (134). Em relação aos estudos com animais, a administração de Enalapril em modelo de insuficiência cardíaca preveniu aumento tanto na atividade gelatinolítica quanto na expressão tecidual de MMP-9. Além dos efeitos anti-remodelamento cardíaco observados (menor diâmetro diastólico do VE e maior fração de encurtamento mesocárdico), os autores encontraram redução na expressão cardíaca de MMP-9 e na atividade gelatinolítica global, sugerindo que o uso de iECA pode ter um efeito indireto sobre a MMP-9 (135). Em concordância com estudo prévio (134), não houve diferença entre os níveis de MMP-9 entre pacientes que estavam sob o uso de inibidores da ECA comparados com os que não estavam em nosso estudo. Em conformidade com esses resultados, o ramipril não alterou as concentrações de MMP-9 em hipertensos(136). Outras classes de anti-hipertensivos têm sido descritas como potenciais inibidores da MMP-9, como por exemplo, os antagonistas do receptor de angiotensina (ARA II). O losartan diminuiu a expressão de MMP-9 em células musculares lisas extraídas de rato (137). Nos estudos clínicos há

controvérsias, tanto o efeito na diminuição nos níveis de MMP-9 (136), como nenhuma alteração também foram descritos (84) após o uso de ARA II. Em nosso estudo, os pacientes não resistentes (HAS) estavam administrando mais ARAII comparados com os HAR, corroborando que a intervenção desta droga talvez não afete os níveis de MMP-9. Ainda, os bloqueadores do canal de cálcio (BCC) por sua ação anti-oxidante diminuiu as concentrações de MMP-9 concomitantemente com os marcadores de estresse oxidativo em pacientes hipertensos (138). Embora não seja possível descartar o efeito dos BCC no presente estudo, dados recentes de nosso laboratório mostraram que pacientes HAR têm níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo, apesar da administração de múltiplas drogas anti-hipertensivas (139, 140), e entre indivíduos HAR utilizando ou não BCC não encontramos diferenças nas concentrações plasmáticas de MMP-9. Por fim, o uso de múltiplas medicações anti-hipertensivas é inerente da definição de HAR, dificultando análises de efeito singular ou sinérgicos das mesmas sobre os biomarcadores.

Na hipertensão, um importante papel das MMPs é sua participação no remodelamento cardiovascular. O remodelamento dos vasos para se adaptar a alta PA envolve degradação e reorganização da MEC e a hipertrofia ou hiperplasia de CMLV, contribuindo assim para o espessamento da parede do vaso e rigidez vascular, que por sua vez, também contribuem para o aumento da PA. As MMPs rompem as interações matriz- célula, levando a alteração da morfologia das CMLV permitindo sua migração e proliferação (46). Nós não encontramos associação da MMP-9 e do TIMP-1 com rigidez arterial em ambos os grupos de hipertensos. Alguns estudos em animais nos fornecem possível explicação para esse achado. Interessantemente, a alta pressão em carótidas retiradas de camundongo aumentou a atividade da MMP-9 e a distensibilidade dessas artérias (141). Outros autores demonstraram que animais que não possuem MMP-9 tiveram a complacência da aorta diminuída levando a maior PA e maior deposição de colágeno após infusão de angiotensina em comparação com os animais selvagens (80). Ou seja, esses resultados sugerem que a MMP-9 nos estágios iniciais da doença têm um papel de promover o remodelamento vascular para acomodar a elevada tensão na parede dos vasos, já na nossa população amostral, a rigidez arterial já está instalada. Inclusive, surpreendentemente o grupo HAS apresentou maior VOP em relação aos HAR. As diferenças significativas na idade entre os dois grupos possivelmente interferiu para que os pacientes de grau leve a moderado, porém com idade

avançada, apresentassem maior VOP em relação aos pacientes HAR, pois é sabido que o envelhecimento é um dos principais determinantes da rigidez arterial (142, 143). Estudos prévios do nosso grupo mostraram os pacientes HAR apresentaram maior rigidez em relação a hipertensos de grau leve a moderado e normotensos quando os grupos foram pareados para idade (20, 21, 144). Tratando-se de estudos clínicos, os níveis de MMP-9 foram associados à rigidez arterial em pacientes com hipertensão sistólica isolada (145) e hipertensão essencial (146). Porém no último estudo, após ajuste para idade e frequência cardíaca, a associação não permaneceu significativa (146), sugerindo que esses fatores podem sobrepor o efeito da MMP-9 sobre a rigidez arterial. Já em sujeitos saudáveis essa associação foi negativa (147), propondo que ao passo que a rigidez aumenta, a MMP-9 diminui, favorecendo o acúmulo de proteínas na matriz extracelular.

Em relação ao remodelamento cardíaco que ocorre na hipertensão, a resposta à alta pressão ou volume, que inicialmente é adaptativa, caracterizada por aumento da espessura dos miócitos, peso cardíaco e da força da contração causando a hipertrofia ventricular. Esse remodelamento torna-se mal-adaptativo na resposta crônica levando a ativação de sinais mecânicos que resultam no alongamento dos miócitos, aumento da câmara ventricular e diminuição da força cardíaca, podendo posteriormente resultar em dilatação cardíaca e insuficiência (57). A hipertrofia ventricular esquerda é caracterizada pela hipertrofia dos cardiomiócitos, proliferação dos fibroblastos e mudanças da arquitetura do colágeno (40). Como esperado, os pacientes HAR tiveram maior prevalência de HVE, bem como maiores IMVE concomitantemente com menor atividade de MMP-9 e maiores níveis de TIMP-1. Outro dado interessante foi que quando classificamos os pacientes HAS e HAR de acordo com a presença de HVE, nós encontramos que aqueles pacientes que possuíam HVE tinham uma relação MMP-9/TIMP-1 diminuída. De maneira similar aos nossos achados, estudo encontrou que os níveis de TIMP-1 estavam aumentados em pacientes com HVE comparados com aqueles sem HVE, sendo que TIMP-1 foi associado à disfunção diastólica (148). Adicionalmente, em nosso trabalho encontramos que os níveis de MMP-9 e a relação MMP-9/TIMP-1 foram positivamente correlacionados com o diâmetro do ventrículo esquerdo no grupo HAR, indicando que neste grupo de pacientes, que já tem um dano cardíaco, a maior atividade MMP-9 deve estar envolvida a um remodelamento cardíaco mais grave ou transição para dilatação do VE. De acordo com essa possível explicação,

em pacientes com insuficiência cardíaca- que possuíam dilatação cardíaca- os níveis de MMP-9 estão aumentados no miocárdio comparados com os controles, refletindo o processo de ruptura da matriz (149). Por fim, a razão MMP-9/TIMP-1 foi positivamente associada com IMVE no grupo HAR, ou seja, quanto maior atividade global de MMP-9, maior a hipertrofia cardíaca. Da mesma maneira, a relação entre TIMP-1 e IMVE foi negativa; quanto menores os níveis de TIMP-1, maior a IMVE.

Em contrapartida, no grupo de HAS, as correlações tiveram padrões opostos, os níveis de TIMP-1 foram positivamente associados ao IMVE, a relação MMP-9/TIMP-1 e os níveis de MMP-9 foram negativamente associados ao DDVE. Conjuntamente, os achados deste estudo nos levaram a possível explicação de que na hipertrofia adaptativa, onde é necessário um remodelamento mais ativo para adaptar-se as mudanças na PA, a razão MMP-9/TIMP-1 é maior. Nesta fase, ocorre aumento da massa cardíaca devido à hipertrofia dos cardiomiócitos e consequente diminuição da câmara ventricular. De acordo, em pacientes HAS, a relação MMP-9/TIMP-1 foi negativamente relacionada ao DDVE, indicando a relação da maior atividade da MMP-9 com a diminuição da câmara do VE, que é esperado na hipertrofia adaptativa. Resumindo, nossos resultados sugerem que a progressão da hipertensão é acompanhada com a modulação transitória da MMP-9 e seu inibidor TIMP-1 concomitantemente com a progressão da doença cardíaca. Em nosso estudo não encontramos evidências da relação entre MMP-9 e TIMP-1 com os parâmetros de função cardíaca. A falta de correlação pode ser devido ao fato que não incluímos pacientes com fração de ejeção fora dos padrões considerados normais.

Ademais, é importante ressaltar que o TIMP-1 também tem outras atividades independentes da ação inibitória da MMP-9 (71). Por exemplo, a super expressão de TIMP-1 em fibroblastos cardíacos estimula sua diferenciação em miofibroblastos e produção de colágeno (72, 150). Esses efeitos não são observados com o uso de inibidor de MMP, sugerindo que é uma ação independente de MMP (151). Em adição, as altas concentrações de TIMP-1 foram associadas à HVE (148), incidência de hipertensão (152) e ocorrência de eventos cardiovasculares após infarto do miocárdio (76), sendo o TIMP-1 sugerido como biomarcador para fibrose do miocárdio (74), e considerado preditor para disfunção ventricular (153) e morte cardiovascular (125).

Por fim, avaliamos três polimorfismos no gene da MMP-9 (-1562C>T, R279Q e Q668R), mas não encontramos diferenças das frequências genóticas ou alélicas entre os grupos estudados. Estudos sugeriram que o alelo T do polimorfismo -1562C>T pode ser utilizado como marcador de risco cardiovascular (154, 155) e foi associado com presença de hipertensão essencial (104) e hipertensão arterial sistólica isolada (156). Entretanto, o alelo T não foi associado com a presença de HAR no nosso estudo. Outros autores também não encontraram associação entre este polimorfismo e hipertensão (101, 157). Além disso, entre os polimorfismos avaliados, pacientes HAR que possuíam o alelo G (ou R) do R279Q tiveram menor PAD que os homocigotos AA. Mas essa relação não permaneceu significativa após ajuste para outras variáveis como idade, raça, presença de diabetes e IMC em regressão logística. Outro estudo mostrou que o polimorfismo R279Q não está relacionado ao risco de hipertensão (101). Enquanto nossos resultados sugeriram que a presença do alelo A poderia estar associado com maiores níveis de PAD, pacientes com angina estável que carregavam o alelo G tiveram menor risco que os homocigotos AA (154). Também, outro grande estudo que mostrou que sujeitos portadores do alelo G tinham menor risco para AVC (106).

Em análises adicionais, não observamos efeito dos genótipos da MMP-9 na prevalência de rigidez arterial ou HVE, mesmo quando os grupos foram combinados. Em contrapartida, pacientes com doença coronariana que eram portadores do alelo T possuíam maior rigidez em comparação com homocigotos CC (158). De maneira similar, a VOP, PAS e os níveis de MMP-9 foram maiores em hipertensos nunca tratados portadores do alelo T (159). A falta de associação em nosso estudo pode ser devido ao dano vascular causado pelo longo período de hipertensão, e como discutido anteriormente, a influência da idade sobre a rigidez arterial. Além disso, nenhuma associação foi encontrada entre os genótipos e a presença de HVE. Interessantemente, estudo prévio mostrou que o haplótipo “T, H, Q” composto pelos polimorfismos: “-1562C>T (rs3918242), -90 (CA)14–24(rs2234681) e R279Q (rs17576)” foi associado a IMVE em pacientes hipertensos (101). Os mesmos autores demonstraram que o polimorfismo -90(CA)14–24 está relacionado à hipertensão, mas não os polimorfismos -1562C>T e R279Q. Assim, supomos que a relação entre IMVE e o haplótipo da MMP-9 seja devido à adição do polimorfismo -90(CA)14–24, que não foi avaliado no presente estudo. Em nosso trabalho, encontramos 6 haplótipos que tiveram frequência similares entre HAS e HAR. Estes

haplótipos não afetaram os níveis de MMP-9 ou as características clínicas dos grupos estudados.

Nós avaliamos se os polimorfismos da MMP-9 interferiam em suas concentrações plasmáticas, mas nenhuma diferença foi encontrada entre os genótipos em ambos os grupos, mesmos quando estes foram agregados. Outros autores também não encontraram associação entre o polimorfismo -1562C>T e a atividade ou concentração de MMP-9 em indivíduos saudáveis (160-162) ou pacientes com pré-eclampsia (163). Por outro lado, o alelo T foi relacionado a maiores níveis de MMP-9 em indivíduos com síndrome metabólica (164), crianças obesas (165) e pacientes com doença coronariana (166). Na população tailandesa, os polimorfismos -1562C>T e Q668R, que estavam em desequilíbrio de ligação, afetaram os níveis de MMP-9, (167), mas os mesmos autores mostraram que importantes fatores influenciam nas concentrações de MMP-9 como idade, glicemia e proteína C reativa (20). Essas características são inerentes da nossa população de estudo, os quais eram em sua maioria idosos, tinham altos níveis de PCR ( $\leq 2.0$  mg/L) e glicemia. Portanto, consideramos a possibilidade que diante dos diversos fatores que afetam os níveis de MMP-9, se houver algum efeito destes polimorfismos este seria muito pequeno e não foi detectado no presente estudo.

Nosso estudo apresenta limitações, dentre elas: (1) o tamanho amostral foi relativamente pequeno, mas análise estatística mostrou que tínhamos poder suficiente para o objetivo primário; (2) os pacientes estavam sob o uso de múltiplas medicações que podem interferir nos níveis de MMP-9 e TIMP-1 ou ocultar o efeito genético (3) nosso estudo caso-controle não estava pareado para idade.

## 6. CONCLUSÃO

Nesse estudo encontramos que pacientes hipertensos resistentes têm maiores concentrações plasmáticas de TIMP-1, menores níveis de MMP-9 e menor razão MMP-9/TIMP-1 quando comparados aos hipertensos não resistentes. As concentrações de TIMP-1 foram positivamente correlacionadas com IMVE em hipertensos de grau leve a moderado e a MMP-9 e a relação MMP-9/TIMP-1 inversamente correlacionados ao DDVE neste grupo. Já nos pacientes HAR, os níveis de TIMP-1 foram inversamente correlacionados com IMVE, enquanto a razão MMP-9/TIMP-1 foi positivamente associada ao DDVE. Assim, a menor relação de MMP-9/TIMP-1 pode estar associada a um estágio mais avançado de remodelamento do ventrículo esquerdo presente nos hipertensos resistentes. Nossos resultados sugerem que o equilíbrio entre MMP-9 e TIMP-1 varia de acordo com a gravidade da hipertensão e estão associados com o remodelamento cardíaco que acompanha a progressão da doença cardíaca. Além disso, nossos dados demonstraram que os polimorfismos genéticos da MMP-9 (rs3918242, rs17576 e rs17577) não estão relacionados com o fenótipo de hipertensão resistente e lesões de órgãos-alvo e não afetam os níveis plasmáticos de MMP-9 nos hipertensos estudados.

## 7. REFERÊNCIAS

1. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, et al. 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *Jama-J Am Med Assoc.* 2014;311(5):507-20.
2. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2010;95:I-III.
3. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2013;34(28):2159-219. Epub 2013/06/19.
4. Lewington S. Prospective studies collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies (vol 360, pg 1903, 2002). *Lancet.* 2003;361(9362):1060-.
5. Britton KA, Gaziano JM, Djousse L. Normal systolic blood pressure and risk of heart failure in US male physicians. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(12):1129-34.
6. Wright JT, Jr., Williamson JD, Whelton PK, Snyder JK, Sink KM, Rocco MV, et al. A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control. *N Engl J Med.* 2015;373(22):2103-16. Epub 2015/11/10.
7. Yoon PW, Gillespie CD, George MG, Wall HK. Control of hypertension among adults--National Health and Nutrition Examination Survey, United States, 2005-2008. *MMWR Morbidity and mortality weekly report.* 2012;61 Suppl:19-25. Epub 2012/06/15.
8. Chobanian AV. Shattuck Lecture. The hypertension paradox--more uncontrolled disease despite improved therapy. *N Engl J Med.* 2009;361(9):878-87. Epub 2009/08/28.
9. Nwankwo T, Yoon SS, Burt V, Gu Q. Hypertension among adults in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey, 2011-2012. *NCHS Data Brief.* 2013(133):1-8. Epub 2013/11/01.
10. 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. *Hypertension.* 2008;51(6):1403-19. Epub 2008/04/09.
11. Hameed MA, Tebbit L, Jacques N, Thomas M, Dasgupta I. Non-adherence to antihypertensive medication is very common among resistant hypertensives: results of a directly observed therapy clinic. *J Hum Hypertens.* 2016;30(2):83-9. Epub 2015/05/08.
12. Florczak E, Tokarczyk B, Warchol-Celinska E, Szwench-Pietrasz E, Prejbisz A, Gosk M, et al. Assessment of adherence to treatment in patients with resistant hypertension using toxicological serum analysis. A subgroup evaluation of the RESIST-POL study. *Pol Arch Med Wewn.* 2015;125(1-2):65-72. Epub 2015/01/13.
13. de Souza WA, Sabha M, de Faveri Favero F, Bergsten-Mendes G, Yugar-Toledo JC, Moreno H. Intensive monitoring of adherence to treatment helps to identify "true" resistant hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2009;11(4):183-91. Epub 2009/07/21.
14. de Souza WA, Yugar-Toledo JC, Bergsten-Mendes G, Sabha M, Moreno H, Jr. Effect of pharmaceutical care on blood pressure control and health-related quality of life in patients with resistant hypertension. *Am J Health Syst Pharm.* 2007;64(18):1955-61. Epub 2007/09/08.
15. Pimenta E, Gaddam KK, Oparil S, Aban I, Husain S, Dell'Italia LJ, et al. Effects of dietary sodium reduction on blood pressure in subjects with resistant hypertension: results from a randomized trial. *Hypertension.* 2009;54(3):475-81. Epub 2009/07/22.
16. Salles GF, Cardoso CR, Muxfeldt ES. Prognostic influence of office and ambulatory blood pressures in resistant hypertension. *Arch Intern Med.* 2008;168(21):2340-6. Epub 2008/11/26.

17. Krieger EM, Drager LF, Giorgi DM, Krieger JE, Pereira AC, Barreto-Filho JA, et al. Resistant hypertension optimal treatment trial: a randomized controlled trial. *Clin Cardiol.* 2014;37(1):1-6. Epub 2013/12/18.
18. Massierer D, Oliveira AC, Steinhorst AM, Gus M, Ascoli AM, Goncalves SC, et al. Prevalence of resistant hypertension in non-elderly adults: prospective study in a clinical setting. *Arq Bras Cardiol.* 2012;99(1):630-5. Epub 2012/05/30.
19. Lotufo PA, Pereira AC, Vasconcellos PS, Santos IS, Mill JG, Bensenor IM. Resistant hypertension: risk factors, subclinical atherosclerosis, and comorbidities among adults-the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2015;17(1):74-80. Epub 2014/10/24.
20. Martins LC, Figueiredo VN, Quinaglia T, Boer-Martins L, Yugar-Toledo JC, Martin JF, et al. Characteristics of resistant hypertension: ageing, body mass index, hyperaldosteronism, cardiac hypertrophy and vascular stiffness. *J Hum Hypertens.* 2011;25(9):532-8. Epub 2010/10/12.
21. Barbaro NR, Fontana V, Modolo R, De Faria AP, Sabbatini AR, Fonseca FH, et al. Increased arterial stiffness in resistant hypertension is associated with inflammatory biomarkers. *Blood Press.* 2014:1-7. Epub 2014/07/26.
22. Cuspidi C, Macca G, Sampieri L, Michev I, Salerno M, Fusi V, et al. High prevalence of cardiac and extracardiac target organ damage in refractory hypertension. *J Hypertens.* 2001;19(11):2063-70. Epub 2001/10/26.
23. Daugherty SL, Powers JD, Magid DJ, Tavel HM, Masoudi FA, Margolis KL, et al. Incidence and prognosis of resistant hypertension in hypertensive patients. *Circulation.* 2012;125(13):1635-42. Epub 2012/03/02.
24. Moreno H, Calhoun DA. True resistant hypertension: definition and prevalence. *J Hypertens.* 2012;30(11):2241-2; author reply 2-3. Epub 2012/10/12.
25. Moreno H, Jr., Coca A. Resistant and refractory hypertension: reflections on pathophysiology and terminology. *Blood Press.* 2012;21(4):209-10. Epub 2012/07/24.
26. Sim JJ, Bhandari SK, Shi J, Reynolds K, Calhoun DA, Kalantar-Zadeh K, et al. Comparative risk of renal, cardiovascular, and mortality outcomes in controlled, uncontrolled resistant, and nonresistant hypertension. *Kidney Int.* 2015;88(3):622-32. Epub 2015/05/07.
27. Williams B, MacDonald TM, Morant S, Webb DJ, Sever P, McInnes G, et al. Spironolactone versus placebo, bisoprolol, and doxazosin to determine the optimal treatment for drug-resistant hypertension (PATHWAY-2): a randomised, double-blind, crossover trial. *Lancet.* 2015;386(10008):2059-68. Epub 2015/09/29.
28. Catena C, Colussi G, Brosolo G, Novello M, Sechi LA. Aldosterone and Left Ventricular Remodeling. *Horm Metab Res.* 2015;47(13):981-6. Epub 2015/11/14.
29. Ritter AM, Fontana V, Faria AP, Modolo R, Barbaro NR, Sabbatini AR, et al. Association of Mineralocorticoid Receptor Polymorphism I180V With Left Ventricular Hypertrophy in Resistant Hypertension. *Am J Hypertens.* 2016;29(2):245-50. Epub 2015/06/07.
30. de Faria AP, Demacq C, Figueiredo VN, Moraes CH, Santos RC, Sabbatini AR, et al. Hypoadiponectinemia and aldosterone excess are associated with lack of blood pressure control in subjects with resistant hypertension. *Hypertens Res.* 2013;36(12):1067-72. Epub 2013/08/24.
31. Ubaid-Girioli S, Adriana de Souza L, Yugar-Toledo JC, Martins LC, Ferreira-Melo S, Coelho OR, et al. Aldosterone excess or escape: Treating resistant hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2009;11(5):245-52. Epub 2009/06/19.
32. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: durability of blood pressure reduction out to 24 months. *Hypertension.* 2011;57(5):911-7. Epub 2011/03/16.
33. Esler MD, Krum H, Sobotka PA, Schlaich MP, Schmieder RE, Bohm M. Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9756):1903-9. Epub 2010/11/26.
34. Bhatt DL, Kandzari DE, O'Neill WW, D'Agostino R, Flack JM, Katzen BT, et al. A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *N Engl J Med.* 2014;370(15):1393-401. Epub 2014/04/01.

35. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002;359(9311):995-1003. Epub 2002/04/09.
36. Jamerson K, Weber MA, Bakris GL, Dahlof B, Pitt B, Shi V, et al. Benazepril plus amlodipine or hydrochlorothiazide for hypertension in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2008;359(23):2417-28. Epub 2008/12/05.
37. Messerli FH, Grossman E. Doxazosin arm of the ALLHAT study discontinued: how equal are antihypertensive drugs? Antihypertensive and Lipid Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial. *Curr Hypertens Rep*. 2000;2(3):241-2. Epub 2000/09/12.
38. Modolo R, de Faria AP, Sabbatini AR, Barbaro NR, Ritter AM, Moreno H. Refractory and resistant hypertension: characteristics and differences observed in a specialized clinic. *J Am Soc Hypertens*. 2015;9(5):397-402. Epub 2015/05/17.
39. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA*. 1996;275(20):1557-62. Epub 1996/05/22.
40. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000;102(4):470-9. Epub 2000/07/25.
41. Tsao CW, Gona PN, Salton CJ, Chuang ML, Levy D, Manning WJ, et al. Left Ventricular Structure and Risk of Cardiovascular Events: A Framingham Heart Study Cardiac Magnetic Resonance Study. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(9):e002188. Epub 2015/09/17.
42. Feitosa GSFF, G.S.; Carvalho, E.N. Alterações cardiovasculares da hipertensão arterial: hipertrofia ventricular esquerda, doença arterial coronária e insuficiência cardíaca. *Rev Bras Hipertensão*. 2002;9:280-7.
43. 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;289(19):2560-72. Epub 2003/05/16.
44. O'Rourke MF, Mancia G. Arterial stiffness. *J Hypertens*. 1999;17(1):1-4. Epub 1999/04/01.
45. Payne RA, Wilkinson IB, Webb DJ. Arterial stiffness and hypertension: emerging concepts. *Hypertension*. 2010;55(1):9-14. Epub 2009/12/02.
46. Castro MM, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Matrix metalloproteinases: targets for doxycycline to prevent the vascular alterations of hypertension. *Pharmacol Res*. 2011;64(6):567-72. Epub 2011/04/26.
47. Safar ME, Lacolley P. Disturbance of macro- and microcirculation: relations with pulse pressure and cardiac organ damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):H1-7. Epub 2007/03/21.
48. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):932-43. Epub 2005/02/26.
49. Lemarie CA, Tharaux PL, Lehoux S. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(3):433-9. Epub 2009/10/20.
50. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension*. 2001;37(5):1236-41. Epub 2001/05/23.
51. Blacher J, Asmar R, Djane S, London GM, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension*. 1999;33(5):1111-7. Epub 1999/05/20.
52. Asmar RG, Brunel PC, Pannier BM, Lacolley PJ, Safar ME. Arterial distensibility and ambulatory blood pressure monitoring in essential hypertension. *Am J Cardiol*. 1988;61(13):1066-70. Epub 1988/05/01.
53. Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P, Pannier B, Brisac AM, et al. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension*. 1995;26(3):485-90. Epub 1995/09/01.
54. Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano AI, Gautier I, Laloux B, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke*. 2003;34(5):1203-6. Epub 2003/04/05.

55. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation*. 1999;99(18):2434-9. Epub 1999/05/11.
56. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):581-7. Epub 2001/09/22.
57. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006;367(9507):356-67. Epub 2006/01/31.
58. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*. 2000;19(23):6341-50. Epub 2000/12/02.
59. Johnson C, Galis ZS. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(1):54-60. Epub 2003/10/11.
60. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*. 2006;69(3):562-73. Epub 2006/01/13.
61. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1285-342. Epub 2007/10/12.
62. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001;11(9):372-7. Epub 2001/08/22.
63. Guimaraes DA, Rizzi E, Ceron CS, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Shiva S, et al. Atorvastatin and sildenafil decrease vascular TGF-beta levels and MMP-2 activity and ameliorate arterial remodeling in a model of renovascular hypertension. *Redox Biol*. 2015;6:386-95. Epub 2015/09/08.
64. Gilet A, Zou F, Boumenir M, Fripiat JP, Thornton SN, Lacolley P, et al. Aldosterone up-regulates MMP-9 and MMP-9/NGAL expression in human neutrophils through p38, ERK1/2 and PI3K pathways. *Exp Cell Res*. 2015;331(1):152-63. Epub 2014/12/03.
65. Hung CS, Chou CH, Liao CW, Lin YT, Wu XM, Chang YY, et al. Aldosterone Induces Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Expression and Further Contributes to Collagen Accumulation: From Clinical to Bench Studies. *Hypertension*. 2016;67(6):1309-20. Epub 2016/04/27.
66. Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta*. 2012;413(7-8):656-62. Epub 2012/01/17.
67. Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48(3):222-72. Epub 2013/04/04.
68. Cauwe B, Martens E, Proost P, Opdenakker G. Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase B/MMP-9 substrates. *Integr Biol (Camb)*. 2009;1(5-6):404-26. Epub 2009/12/22.
69. Rodrigues SF, Tran ED, Fortes ZB, Schmid-Schonbein GW. Matrix metalloproteinases cleave the beta2-adrenergic receptor in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(1):H25-35. Epub 2010/04/13.
70. Guedez L, Courtemanch L, Stetler-Stevenson M. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood*. 1998;92(4):1342-9. Epub 1998/08/08.
71. Westermann D, Heymans S. Fibrosis or hypertrophy: let TIMPs decide. *Cardiovascular research*. 2014;103(2):196-7. Epub 2014/06/25.
72. Lovelock JD, Baker AH, Gao F, Dong JF, Bergeron AL, McPheat W, et al. Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(2):H461-8. Epub 2005/01/15.
73. Akahane T, Akahane M, Shah A, Connor CM, Thorgeirsson UP. TIMP-1 inhibits microvascular endothelial cell migration by MMP-dependent and MMP-independent mechanisms. *Exp Cell Res*. 2004;301(2):158-67. Epub 2004/11/09.
74. Heymans S, Schroen B, Vermeersch P, Milting H, Gao F, Kassner A, et al. Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is

related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation*. 2005;112(8):1136-44. Epub 2005/08/17.

75. Creemers EE, Davis JN, Parkhurst AM, Leenders P, Dowdy KB, Hapke E, et al. Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(1):H364-71. Epub 2002/10/22.
76. Kelly D, Squire IB, Khan SQ, Dhillon O, Narayan H, Ng KH, et al. Usefulness of plasma tissue inhibitors of metalloproteinases as markers of prognosis after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2010;106(4):477-82. Epub 2010/08/10.
77. Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta*. 2012. Epub 2012/01/17.
78. Romanic AM, Harrison SM, Bao W, Burns-Kurtis CL, Pickering S, Gu J, et al. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res*. 2002;54(3):549-58. Epub 2002/05/29.
79. Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, deBlois D, Moreau P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension*. 2005;45(3):432-7. Epub 2005/01/19.
80. Flamant M, Placier S, Dubroca C, Esposito B, Lopes I, Chatziantoniou C, et al. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension*. 2007;50(1):212-8. Epub 2007/05/23.
81. Guimaraes DA, Rizzi E, Ceron CS, Oliveira AM, Oliveira DM, Castro MM, et al. Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;108(5):318-25. Epub 2010/12/24.
82. DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Proteinase activity and receptor cleavage: mechanism for insulin resistance in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 2008;52(2):415-23. Epub 2008/07/09.
83. Fontana V, Silva PS, Belo VA, Antonio RC, Ceron CS, Biagi C, et al. Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;109(2):130-7. Epub 2011/03/16.
84. Li-Saw-Hee FL, Edmunds E, Blann AD, Beevers DG, Lip GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 levels in essential hypertension. Relationship to left ventricular mass and anti-hypertensive therapy. *Int J Cardiol*. 2000;75(1):43-7. Epub 2000/10/31.
85. Hansson J, Vasan RS, Arnlov J, Ingelsson E, Lind L, Larsson A, et al. Biomarkers of Extracellular Matrix Metabolism (MMP-9 and TIMP-1) and Risk of Stroke, Myocardial Infarction, and Cause-Specific Mortality: Cohort Study. *PLoS One*. 2011;6(1):e16185. Epub 2011/02/02.
86. Lacerda L, Faria AP, Fontana V, Moreno H, Sandrim V. Role Of MMP-2 and MMP-9 in Resistance to Drug Therapy in Patients with Resistant Hypertension. *Arq Bras Cardiol*. 2015;105(2):168-75. Epub 2015/06/04.
87. Fontana V, McDonough CW, Gong Y, El Rouby NM, Sa AC, Taylor KD, et al. Large-scale gene-centric analysis identifies polymorphisms for resistant hypertension. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(6):e001398. Epub 2014/11/12.
88. El Rouby N, Cooper-DeHoff RM. Genetics of resistant hypertension: a novel pharmacogenomics phenotype. *Curr Hypertens Rep*. 2015;17(9):583. Epub 2015/07/23.
89. Ritter AM, Fontana V, de Faria AP, Modolo R, Barbaro NR, Sabbatini AR, et al. Association of Mineralocorticoid Receptor Polymorphism I180V With Left Ventricular Hypertrophy in Resistant Hypertension. *Am J Hypertens*. 2016;29(2):245-50. Epub 2015/06/07.
90. de Faria AP, Modolo R, Sabbatini AR, Barbaro NR, Correa NB, Brunelli V, et al. Adiponectin -11377C/G and +276G/T polymorphisms affect adiponectin levels but do not modify responsiveness to therapy in resistant hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015;117(1):65-72. Epub 2014/12/30.

91. Fontana V, de Faria AP, Barbaro NR, Sabbatini AR, Modolo R, Lacchini R, et al. Modulation of aldosterone levels by -344 C/T CYP11B2 polymorphism and spironolactone use in resistant hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2014;8(3):146-51. Epub 2014/01/07.
92. Lynch AI, Irvin MR, Davis BR, Ford CE, Eckfeldt JH, Arnett DK. Genetic and Adverse Health Outcome Associations with Treatment Resistant Hypertension in GenHAT. *Int J Hypertens*. 2013;2013:578578. Epub 2013/11/30.
93. Lacchini R, Sabha M, Coeli FB, Favero FF, Yugar-Toledo J, Izidoro-Toledo TC, et al. T allele of -344 C/T polymorphism in aldosterone synthase gene is not associated with resistant hypertension. *Hypertens Res*. 2009;32(2):159-62. Epub 2009/03/06.
94. 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;40(3):309-16. Epub 2007/03/06.
95. Yugar-Toledo JC, Martin JF, Krieger JE, Pereira AC, Demacq C, Coelho OR, et al. Gene variation in resistant hypertension: multilocus analysis of the angiotensin 1-converting enzyme, angiotensinogen, and endothelial nitric oxide synthase genes. *DNA Cell Biol*. 2011;30(8):555-64. Epub 2011/03/29.
96. Gong Y, McDonough CW, Beitelshes AL, El Roubay N, Hiltunen TP, O'Connell JR, et al. PTPRD gene associated with blood pressure response to atenolol and resistant hypertension. *J Hypertens*. 2015;33(11):2278-85. Epub 2015/10/02.
97. Spinasse LB, Santos AR, Suffys PN, Muxfeldt ES, Salles GF. Different phenotypes of the NAT2 gene influences hydralazine antihypertensive response in patients with resistant hypertension. *Pharmacogenomics*. 2014;15(2):169-78. Epub 2014/01/22.
98. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Coeli-Lacchini FB, Junior HM, Tanus-Santos JE. Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with hypertension and responsiveness to antihypertensive drug therapy. *Gene*. 2013;515(2):391-5. Epub 2012/12/26.
99. Sandrim VC, Yugar-Toledo JC, Desta Z, Flockhart DA, Moreno H, Jr., Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are related to blood pressure elevation, but not to resistance to antihypertensive drug therapy. *J Hypertens*. 2006;24(12):2393-7. Epub 2006/11/04.
100. NCBI Reference Sequence: NG\_011468.. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG\\_011468.1?from=5001&to=12654&report=genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_011468.1?from=5001&to=12654&report=genbank). GenBank. Acessado em:31/03/2016.
101. Lacchini R, Jacob-Ferreira AL, Luizon MR, Coeli FB, Izidoro-Toledo TC, Gasparini S, et al. Matrix metalloproteinase 9 gene haplotypes affect left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1940-4. Epub 2010/08/17.
102. Juan Z, Wei-Guo Z, Heng-Liang S, Da-Guo W. Association of Matrix Metalloproteinase 9 C-1562T Polymorphism with Genetic Susceptibility to Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2015;77:40-5. Epub 2015/06/18.
103. Buraczynska K, Kurzepa J, Ksiazek A, Buraczynska M, Rejdak K. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Gene Polymorphism in Stroke Patients. *Neuromolecular Med*. 2015;17(4):385-90. Epub 2015/09/04.
104. Yang W, Lu J, Yang L, Zhang J. Association of Matrix Metalloproteinase-9 Gene -1562C/T Polymorphism with Essential Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis Article. *Iran J Public Health*. 2015;44(11):1445-52. Epub 2016/01/09.
105. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99(14):1788-94. Epub 1999/04/13.
106. Tanner RM, Lynch AI, Brophy VH, Eckfeldt JH, Davis BR, Ford CE, et al. Pharmacogenetic associations of MMP9 and MMP12 variants with cardiovascular disease in patients with hypertension. *PLoS One*. 2011;6(8):e23609. Epub 2011/09/03.
107. Lynch AI, Eckfeldt JH, Davis BR, Ford CE, Boerwinkle E, Leiendecker-Foster C, et al. Gene panels to help identify subgroups at high and low risk of coronary heart disease among those

- randomized to antihypertensive treatment: the GenHAT study. *Pharmacogenet Genomics*. 2012;22(5):355-66. Epub 2012/03/06.
108. Cotignola J, Reva B, Mitra N, Ishill N, Chuai S, Patel A, et al. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. *BMC Med Genet*. 2007;8:10. Epub 2007/03/10.
109. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(1 Suppl):1-51. Epub 2010/12/01. VI Diretrizes Brasileiras de hipertensao.
110. V Diretrizes Brasileiras de Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA). *Rev Bras Hipertens* 2011;8(1):7-17.
111. White WB, Anwar YA. Evaluation of the overall efficacy of the Omron office digital blood pressure HEM-907 monitor in adults. *Blood Press Monit*. 2001;6(2):107-10. Epub 2001/07/04.
112. 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;27(21):2588-605. Epub 2006/09/27.
113. Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H, et al. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation*. 2006;113(5):664-70. Epub 2006/02/08.
114. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens*. 30(3):445-8. Epub 2012/01/27.
115. Cheitlin MD, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, Davis JL, et al. ACC/AHA/ASE 2003 Guideline Update for the Clinical Application of Echocardiography: summary article. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to Update the 1997 Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography). *J Am Soc Echocardiogr*. 2003;16(10):1091-110. Epub 2003/10/21.
116. Novaes CM P-AM. Uma revolução tecnológica da Reação em Cadeia Polimerase. *Revista biotecnologia ciência e desenvolvimento*. 2004;33:10-3.
117. Zhang B, Ye S, Herrmann S, Eriksson P, de Maat M, Evans A. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation Research*. 1999;99(14):1788-94.
- .
118. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002;90(3):251-62. Epub 2002/02/28.
119. Tayebjee MH, Nadar S, Blann AD, Gareth Beevers D, MacFadyen RJ, Lip GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens*. 2004;17(9):764-9. Epub 2004/09/15.
120. Derosa G, D'Angelo A, Ciccarelli L, Piccinni MN, Pricolo F, Salvadeo S, et al. Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension. *Endothelium*. 2006;13(3):227-31. Epub 2006/07/15.
121. Gkaliagkousi E, Doumas M, Gavriilaki E, Triantafyllou A, Vogiatzis K, Anyfanti P, et al. Elevated levels of MMP-9 in untreated patients with stage I essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2012;34(8):561-6. Epub 2012/05/12.
122. Ergul A, Portik-Dobos V, Hutchinson J, Franco J, Anstadt MP. Downregulation of vascular matrix metalloproteinase inducer and activator proteins in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2004;17(9):775-82. Epub 2004/09/15.
123. Zervoudaki A, Economou E, Stefanadis C, Pitsavos C, Tsioufis K, Aggeli C, et al. Plasma levels of active extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment. *J Hum Hypertens*. 2003;17(2):119-24. Epub 2003/02/08.

124. Dhingra R, Pencina MJ, Schrader P, Wang TJ, Levy D, Pencina K, et al. Relations of Matrix Remodeling Biomarkers to Blood Pressure Progression and Incidence of Hypertension in the Community. *Circulation*. 2009;119(8):1101-U62.
125. Lubos E, Schnabel R, Rupprecht HJ, Bickel C, Messow CM, Prigge S, et al. Prognostic value of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 for cardiovascular death among patients with cardiovascular disease: results from the AtheroGene study. *Eur Heart J*. 2006;27(2):150-6. Epub 2005/10/19.
126. Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem*. 2007;40(1-2):119-23. Epub 2006/12/08.
127. Jung K, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Preanalytical pitfalls of blood sampling to measure true circulating matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Clin Chim Acta*. 2006;373(1-2):180-1; author reply 2. Epub 2006/04/18.
128. Souza-Tarla CD, Uzuelli JA, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem*. 2005;38(5):410-4. Epub 2005/04/12.
129. Marchesi C, Dentali F, Nicolini E, Maresca AM, Tayebjee MH, Franz M, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Hypertension*. 2012;30(1):3-16.
130. Diekmann O, Tschesche H. Degradation of kinins, angiotensins and substance P by polymorphonuclear matrix metalloproteinases MMP 8 and MMP 9. *Braz J Med Biol Res*. 1994;27(8):1865-76. Epub 1994/08/01.
131. Yamamoto D, Takai S, Miyazaki M. Prediction of interaction mode between a typical ACE inhibitor and MMP-9 active site. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354(4):981-4. Epub 2007/02/06.
132. Yamamoto D, Takai S, Miyazaki M. Inhibitory profiles of captopril on matrix metalloproteinase-9 activity. *Eur J Pharmacol*. 2008;588(2-3):277-9. Epub 2008/05/27.
133. Sorbi D, Fadly M, Hicks R, Alexander S, Arbeit L. Captopril inhibits the 72 kDa and 92 kDa matrix metalloproteinases. *Kidney Int*. 1993;44(6):1266-72. Epub 1993/12/01.
134. Fontana V, Silva PS, Izidoro-Toledo TC, Biagi C, Oliveira EB, Gerlach RF, et al. Comprehensive evaluation of the effects of enalapril on matrix metalloproteinases levels in hypertension. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2012;26(6):511-9. Epub 2012/10/23.
135. Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, Nishikawa N, Yoshida J, Hori M, et al. Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodeling in hypertensive heart failure rats: its inhibition as a primary effect of Angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Circulation*. 2004;109(17):2143-9. Epub 2004/03/31.
136. Derosa G, Maffioli P, Ferrari I, Palumbo I, Randazzo S, Fogari E, et al. Different actions of losartan and ramipril on adipose tissue activity and vascular remodeling biomarkers in hypertensive patients. *Hypertens Res*. 2011;34(1):145-51. Epub 2010/11/26.
137. Guo YS, Wu ZG, Yang JK, Chen XJ. Impact of losartan and angiotensin II on the expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rat vascular smooth muscle cells. *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1587-94. Epub 2014/11/19.
138. Martinez ML, Lopes LF, Coelho EB, Nobre F, Rocha JB, Gerlach RF, et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47(1):117-22. Epub 2006/01/21.
139. de Faria AP, Fontana V, Modolo R, Barbaro NR, Sabbatini AR, Pansani IF, et al. Plasma 8-isoprostane levels are associated with endothelial dysfunction in resistant hypertension. *Clin Chim Acta*. 2014;433:179-83. Epub 2014/03/25.
140. Kirabo A, Fontana V, de Faria AP, Loperena R, Galindo CL, Wu J, et al. DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4642-56. Epub 2014/09/23.

141. Lehoux S, Lemarie CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation*. 2004;109(8):1041-7. Epub 2004/02/18.
142. Van Bortel LM, Spek JJ. Influence of aging on arterial compliance. *J Hum Hypertens*. 1998;12(9):583-6. Epub 1998/10/23.
143. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother*. 2003;57(5-6):195-202. Epub 2003/07/31.
144. Figueiredo VN, Yugar-Toledo JC, Martins LC, Martins LB, de Faria AP, de Haro Moraes C, et al. Vascular stiffness and endothelial dysfunction: Correlations at different levels of blood pressure. *Blood Press*. 2012;21(1):31-8. Epub 2011/10/28.
145. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):372. Epub 2004/11/24.
146. Tan J, Hua Q, Xing X, Wen J, Liu R, Yang Z. Impact of the metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 system on large arterial stiffness in patients with essential hypertension. *Hypertens Res*. 2007;30(10):959-63. Epub 2007/12/01.
147. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Dima I, Ioakeimidis N, Vasiliadou C, Zervoudaki A, et al. Negative association between serum levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 and aortic stiffness in healthy adults. *Int J Cardiol*. 2007;122(3):232-8. Epub 2007/02/10.
148. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, et al. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation*. 2006;113(17):2089-96. Epub 2006/04/26.
149. Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTiernan CF. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation*. 1998;98(17):1728-34. Epub 1998/10/27.
150. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49(3):187-98. Epub 2004/03/24.
151. Heymans S, Lupu F, Terclavers S, Vanwetswinkel B, Herbert JM, Baker A, et al. Loss or inhibition of uPA or MMP-9 attenuates LV remodeling and dysfunction after acute pressure overload in mice. *Am J Pathol*. 2005;166(1):15-25. Epub 2005/01/06.
152. Dhingra R, Pencina MJ, Schrader P, Wang TJ, Levy D, Pencina K, et al. Relations of matrix remodeling biomarkers to blood pressure progression and incidence of hypertension in the community. *Circulation*. 2009;119(8):1101-7. Epub 2009/02/18.
153. Lindsay MM, Maxwell P, Dunn FG. TIMP-1: a marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension. *Hypertension*. 2002;40(2):136-41. Epub 2002/08/03.
154. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003;107(12):1579-85. Epub 2003/04/02.
155. Jones GT, Phillips VL, Harris EL, Rossaak JI, van Rij AM. Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2003;38(6):1363-7. Epub 2003/12/19.
156. Huang R, Deng L, Shen A, Liu J, Ren H, Xu DL. Associations of MMP1, 3, 9 and TIMP3 genes polymorphism with isolated systolic hypertension in Chinese Han population. *Int J Med Sci*. 2013;10(7):840-7. Epub 2013/06/26.
157. Bayramoglu A, Kucuk M, Guler HI, Abaci O, Kucukkaya Y, Colak E. Is there any genetic predisposition of MMP-9 gene C1562T and MTHFR gene C677T polymorphisms with essential hypertension? *Cytotechnology*. 2015;67(1):115-22.

158. Yasmin, McEniery CM, O'Shaughnessy KM, Harnett P, Arshad A, Wallace S, et al. Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(8):1799-805. Epub 2006/05/20.
159. Zhou S, Feely J, Spiers JP, Mahmud A. Matrix metalloproteinase-9 polymorphism contributes to blood pressure and arterial stiffness in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2007;21(11):861-7. Epub 2007/06/22.
160. Demacq C, de Souza AP, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase (MMP)-9 does not affect plasma MMP-9 activity in healthy subjects. *Clin Chim Acta.* 2006;365(1-2):183-7. Epub 2005/09/20.
161. Metzger IF, Luizon MR, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Genetic variants in matrix metalloproteinase-9 gene modify metalloproteinase-9 levels in black subjects. *DNA Cell Biol.* 2012;31(4):504-10. Epub 2011/09/23.
162. Demacq C, Vasconcellos VB, Marcaccini AM, Gerlach RF, Silva WA, Jr., Tanus-Santos JE. Functional polymorphisms in the promoter of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene are not linked with significant plasma MMP-9 variations in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(1):57-63. Epub 2008/01/16.
163. Palei AC, Sandrim VC, Amaral LM, Machado JS, Cavalli RC, Lacchini R, et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms affect plasma MMP-9 levels and antihypertensive therapy responsiveness in hypertensive disorders of pregnancy. *Pharmacogenomics J.* 2012;12(6):489-98. Epub 2011/07/20.
164. Yadav SS, Mandal RK, Singh MK, Verma A, Dwivedi P, Sethi R, et al. High serum level of matrix metalloproteinase 9 and promoter polymorphism - 1562 C:T as a new risk factor for metabolic syndrome. *DNA Cell Biol.* 2014;33(11):816-22. Epub 2014/09/12.
165. Belo VA, Souza-Costa DC, Luizon MR, Lanna CM, Carneiro PC, Izidoro-Toledo TC, et al. Matrix metalloproteinase-9 genetic variations affect MMP-9 levels in obese children. *Int J Obes (Lond).* 2012;36(1):69-75. Epub 2011/08/17.
166. Wu HD, Bai X, Chen DM, Cao HY, Qin L. Association of genetic polymorphisms in matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease in the Chinese Han population: a case-control study. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013;17(9):707-12. Epub 2013/07/04.
167. Wu S, Hsu LA, Teng MS, Lin JF, Chang HH, Chang PY, et al. Association of matrix metalloproteinase 9 genotypes and cardiovascular disease risk factors with serum matrix metalloproteinase 9 concentrations in Taiwanese individuals. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(4):543-9. Epub 2010/02/27.

## 8. ANEXOS

### 8.1 ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Polimorfismos genéticos das metaloproteinases da matriz extracelular na hipertensão resistente

**Pesquisador:** Heitor Moreno Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 11189712.8.0000.5404

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas - UNICAMP

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 188.161

**Data da Relatoria:** 18/01/2013

##### Apresentação do Projeto:

O pesquisador esclarece que a hipertensão arterial resistente (HAR) é caracterizada por níveis pressóricos elevados mesmo sob o uso concomitante de três classes diferentes de anti-hipertensivos em uma combinação racional de doses máximas, sendo um deles um diurético, ou ainda pressão controlada com uso de quatro ou mais anti-hipertensivos. Sabe-se que a HAR representa prognóstico desfavorável e a morbidade e mortalidade são consequências da alta prevalência de lesões de órgãos-alvo, incluindo hipertrofia ventricular esquerda e rigidez arterial nestes pacientes. A família das metaloproteinases (MMPs) é composta por enzimas que degradam proteínas da matriz extracelular e estão intimamente envolvidas no remodelamento dos tecidos cardíaco e vascular nas lesões de órgãos-alvo que acompanha as doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão. Diversos estudos em modelos animais e em humanos mostraram níveis aumentados das MMPs -2 e -9 na hipertensão arterial. Níveis aumentados de MMP-9 foram descritos como preditores de mortalidade cardiovascular, sendo ainda que esta enzima possui estreita relação com mecanismos inflamatórios. No entanto, na hipertensão resistente não há estudos que demonstrem a participação ou não de tais enzimas ou sua relação com lesões de órgãos-alvo neste grupo de pacientes. O objetivo do presente estudo é avaliar a associação dos níveis e atividade das MMPs -2 e -9 e seus inibidores, TIMP-1 e -2, bem como dos polimorfismos genéticos nestas duas enzimas com hipertrofia ventricular esquerda, rigidez arterial, perfil inflamatório, bem como outros fenótipos associados à HAR e à HA, incluindo presença de apneia obstrutiva do sono e falha no controle da pressão arterial.

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



Trata-se de estudo observacional do tipo transversal, que avaliará 130 pacientes portadores de hipertensão arterial resistente verdadeira e 130 hipertensos classificados como hipertensos leves e moderados quanto à participação das metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) em fatores fenotípicos relacionados à doença. Também serão realizados estudos de associação entre esses polimorfismos genéticos e seus níveis plasmáticos nos mesmos pacientes.

A metodologia para realização do estudo inclui a anamnese e os exames laboratoriais de rotina que serão realizados no HC-UNICAMP. Serão realizadas avaliações clínicas do paciente pelos seguintes métodos: medida da pressão arterial por um modo não-invasivo durante 20 minutos, ecocardiograma, monitoração ambulatorial da pressão arterial (MAPA), polissonografia para avaliação de distúrbios do sono e análise de sangue e urina. Os sujeitos de pesquisa deverão comparecer em 2 ocasiões e em ambas será realizada a coleta de exames laboratoriais. A realização da polissonografia será na própria residência do sujeito de pesquisa por meio de aparelho portátil.

**Objetivo da Pesquisa:**

1- Avaliar os níveis plasmáticos e atividade da MMP-2 e da MMP-9, bem como de seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2 em pacientes hipertensos resistentes e hipertensos leves e moderados, bem como investigar se tais níveis se correlacionam ou predizem os seguintes fenótipos: hipertrofia ventricular esquerda, rigidez arterial, resistência farmacológica ao tratamento, dentre outras.

2- Determinar os genótipos e haplótipos dos polimorfismos genéticos para a MMP-2 e para a MMP-9 e avaliar se há relação com os fenótipos da doença e com os níveis e atividades das MMPs plasmáticas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A pesquisa não envolve riscos para os pacientes, exceto o desconforto relacionado à punção venosa para coleta das amostras de sangue. Os demais exames a serem realizados são considerados não-invasivos. Não haverá benefícios diretos para os sujeitos de pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto de pesquisa é relevante devido à importância da condição representada pela hipertensão arterial resistente. Está bem elaborado e com referências atualizadas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A folha de rosto está assinada pelo pesquisador responsável e pelo responsável pela instituição proponente (HC-UNICAMP). O cronograma está adequado e o orçamento contará com as fontes de financiamento indicadas no projeto de pesquisa (FAPESP e CNPq). O termo de consentimento livre e esclarecido está redigido de maneira adequada e com linguagem acessível. O TCLE contém as opções previstas na resolução 441/2011 CNS/MS referentes à formação de banco de material

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: oep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



biológico (biorrepositório).

**Recomendações:**

1. Lembramos que o TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador (resolução 196/96 CNS/MS, artigo IV.2 "d").
2. Se o TCLE tiver mais de uma página, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular no. 003/2011/CONEP/CNS).
3. No cronograma, observar que o início do estudo somente poderá ser realizado após aprovação pelo CEP, conforme compromisso do pesquisador com a resolução 196/96 CNS/MS (artigo IX.2 letra "a").

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As sugestões de adequação do TCLE feitas foram aceitas. Não existem outras pendências relacionadas ao projeto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

CAMPINAS, 23 de Janeiro de 2013

---

**Assinador por:**  
Carlos Eduardo Steiner  
(Coordenador)

## **8.2 ANEXO B: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)**

### **TCLE — Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **Polimorfismos genéticos das metaloproteinases da matriz extracelular na hipertensão resistente**

**Desenho do estudo e objetivo:** O estudo avaliará algumas substâncias produzidas pelo nosso organismo relacionadas à inflamação e a lesão nos vasos, rim e coração em pacientes com hipertensão arterial. Os resultados deste estudo podem contribuir para que o controle da pressão resistente em algumas pessoas seja possível com o uso de determinados medicamentos, além de dietas e atividades físicas. Se decidir participar neste estudo, suas medicações para a hipertensão não serão modificadas, exceto se houver algum motivo médico para isso. Serão realizadas avaliações clínicas do paciente pelos seguintes métodos: medida da pressão arterial por um modo não invasivo (monitor de pressão arterial colocado em um dedo da mão) durante 20 minutos, ecocardiograma, monitoração ambulatorial da pressão arterial (MAPA), polissonografia para avaliação de distúrbios do sono e análise de sangue e urina coletados para avaliar a função dos rins e do coração. Conforme indicação médica, também podem necessários outros exames de sangue e urina, eletrocardiograma, já bem estabelecidos na rotina de atendimento a pacientes com hipertensão arterial resistente.

Atenção: O presente estudo não é um ensaio farmacológico (teste de medicamentos novos). Todos os exames a serem realizados não causam dor ou outros efeitos ruins ao organismo. No entanto, precisaremos de coletas de amostras de sangue (02 colheres de sopa em cada vez), coletado da veia do braço, em duas visitas diferentes.

O estudo será realizado pelo grupo de profissionais do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, no Ambulatório de Hipertensão Resistente do HC-UNICAMP.

Enquanto participando deste estudo, você não deve tomar parte em outro projeto de pesquisa sem a aprovação dos pesquisadores envolvidos nos estudos. Isso visa protegê-lo de possíveis problemas para sua saúde causados, por exemplo, interação de remédios usados em pesquisas simultâneas. Todos os tipos de tratamento ou diagnóstico médico, experimentais ou não, envolvem algum risco de prejuízo à saúde. Apesar de todas as precauções, complicações podem ocorrer decorrentes de sua participação no estudo. Nesse caso, você será encaminhado para assistência médica no próprio hospital.

Responsável pela condução da pesquisa: Prof. Dr. Heitor Moreno Jr.

Nome do paciente:

CPF: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_ nº HC: \_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Se você está grávida ou tem intenção de engravidar, você não poderá participar deste estudo. Por outro lado, se você não tem intenção de engravidar e está em fase de reprodução, deve estar sob uso de método contraceptivo comprovadamente eficaz.

Neste estudo, serão necessárias 2 visitas. Na primeira visita será coletada uma amostra de sangue (02 colheres de sopa) coletada da veia do braço, uma amostra de urina (50mL) e o paciente deverá trazer de casa a urina coletada durante 24 horas do dia anterior. Essas amostras, tanto de sangue, quanto de urina serão utilizadas para realização de exames de rotina de nosso ambulatório.

Em uma segunda visita será coletada outra amostra de sangue (também 02 colheres de sopa) da veia do braço, para estudarmos as enzimas e biomarcadores inflamatórios (substâncias importantes em nosso corpo). Neste mesmo dia, a rigidez de seus vasos sanguíneos será estudada colocando-se um instrumento semelhante a uma caneta, chamado transdutor, sobre vasos de seu braço, do pescoço e da virilha por cerca de até 5 minutos em cada região. Encerrado isso, em seguida, seu coração será observado através de um exame de imagem chamado ecocardiograma, um exame também não invasivo, onde através de outro transdutor é possível o médico observar o funcionamento do coração.

Durante o período destes testes de até 4 horas você ficará deitado no leito com um dos braços confortavelmente apoiado em um suporte de espuma. Um aparelho de pressão será colocado no seu outro braço para medidas da pressão arterial. Para estes testes, não são utilizadas medicações de qualquer ordem, os mesmos não causam dores e não colocam a sua saúde em risco. Pode haver desconforto nas costas pela necessidade de que permaneça deitado por 4 horas ou formigamento no dedo médio em que será colocado o manguito. Ocorrendo essas manifestações ou por outras razões, você, se desejar, pode solicitar que os testes sejam interrompidos imediatamente, e você será dispensado do estudo.

Na última etapa do estudo, será marcada uma data para realização da polissonografia, que será na própria residência do paciente. A equipe profissional irá até a casa e instalará um aparelho que avaliará o sono e possíveis perturbações enquanto o paciente dorme, como ronco e falta de ar.

Após o estudo, o sangue coletado será armazenado, podendo ser utilizado para outras pesquisas. Porém, se você decidir, pode recusar o armazenamento do seu material biológico para este estudo e estudos posteriores, e este material biológico será descartado.

Caso ocorra a identificação de qualquer alteração que comprometa a sua saúde, você será devidamente informado, aconselhado e encaminhado para assistência médica no próprio hospital que conta com equipamentos necessários e profissionais qualificados para atendê-lo.

Responsável pela condução da pesquisa: Prof. Dr. Heitor Moreno Jr.

Nome do paciente:

CPF: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_ nº HC: \_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

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.

Os voluntários participantes deste estudo receberão a quantia de R\$ 50,00 (trinta reais) a título de ressarcimento de gastos com transportes e alimentação no dia da execução do estudo.

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

Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior (Telefone: (19) 35219538) e para denúncias e/ou reclamações entrar em contato com Comitê de Ética e Pesquisa da Unicamp (Telefone: (19) 35218936 ou 35217187).

Aceito que a minha amostra de sangue seja armazenada para pesquisas futuras:

<input type="checkbox"/>	SIM
--------------------------	-----

<input type="checkbox"/>	NÃO
--------------------------	-----

Abaixo, você encontrará os direitos que lhe são assegurados ao cooperar com este estudo:

1. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Prof. Dr. Heitor Moreno Jr. que pode ser encontrado no endereço Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Laboratório de Farmacologia Cardiovascular; Telefone: 3521-9538/3521-7283. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Setor de Farmacologia Cardiovascular e Hipertensão Refratária do Hospital das Clínicas.
2. Este estudo não será iniciado enquanto não for avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.
3. É garantida a liberdade da retirada de seu consentimento para participar do estudo a qualquer momento, ou seja, você pode deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Responsável pela condução da pesquisa: Prof. Dr. Heitor Moreno Jr.

Nome do paciente:

CPF: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_ nº HC: \_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_