

*MAIRA HELENA CITTADINO FAVARELLI*

*ENVOLVIMENTO DO ENDOTÉLIO NA RESPOSTA  
VASCULAR EM PORTADORES DE HIPERTENSÃO  
ARTERIAL RESISTENTE*

*CAMPINAS*

*2001*

***MAIRA HELENA CITTADINO FAVARELLI***

***ENVOLVIMENTO DO ENDOTÉLIO NA RESPOSTA  
VASCULAR EM PORTADORES DE HIPERTENSÃO  
ARTERIAL RESISTENTE***

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

***ORIENTADOR: PROF. DR. HEITOR MORENO JÚNIOR***

***CAMPINAS***

***2001***

*iii*

UNIDADE	(7)
Nº CHAMADA T/UNICAMP	F277e
V	EX
TOMBO N.	48086
	16.837/02
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

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

CM001657B0-1

BIBID 235726

F277e Favarelli, Maira Helena Cittadino  
Envolvimento do endotélio na resposta vascular em portadores de hipertensão arterial resistente / Maira Helena Cittadino Favarelli. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

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

1. Hipertensão. 2. Óxido Nítrico. 3. Endotélio. I. Heitor Moreno Júnior. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

**Orientador:**

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

**Membros:**

1. Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

2. Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior

3. Prof. Dr. Stephen Hyslop

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

Data: 29/06/2001

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Maria de Lourdes e Herval, que sempre me ensinaram a importância de se ter um objetivo na vida, na sua escolha correta, nos cuidados que se deve ter durante a trajetória deste caminho escolhido e no saber como usar essa liberdade que sempre me ofereceram para que, um dia, eu pudesse olhar para trás sem arrependimentos, pois, felizmente, ambos deram-me, com muita sabedoria, a liberdade, o apoio, o carinho e aquelas palavras de incentivo de quem, por experiências de vida, sabe o momento exato para entrar em cena, quando, para mim, parecia impossível. Obrigada pelo exemplo de dignidade humana. Vocês sempre serão os meus guias.*

*A Deus, por estar sempre junto a mim, naqueles momentos em que tudo parecia sem solução. Sua luz trouxe-me esperança e força para recomeçar.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*Ao meu marido, Marcos A. Favarelli, durante as fases mais complicadas deste trabalho, mostrou-me alternativas, sempre confiante.*

*Obrigada por ter percebido que a conclusão deste trabalho significaria para mim mais que um objetivo profissional. Em decorrência disso, compreendi que o carinho e o apoio incondicional de quem nos rodeia e nos ama, é tão ou mais precioso do que o conhecimento em si.*

*Aos meus irmãos, Herval Márcio, Mara Heloísa e Harlei Marcos pelo prosseguimento de um caminho semelhante ao meu, o que, conseqüentemente, complementa a tranqüilidade, o orgulho e a felicidade de nossos pais, e a minha também.*

*Ao Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior, pela oportunidade, amizade, orientação, e por sua surpreendente franqueza que, de início, assustava-me, porém, indispensáveis para a minha formação científica e pessoal. Muito obrigada.*

## *AGRADECIMENTOS*

---

À FAPESP, pelo suporte financeiro dado a este projeto.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, professor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela colaboração em seu laboratório.

Ao Dr. Márcio Gonçalves de Souza, por sua amizade, paciência, pelo apoio, sugestões, auxílio no desenvolvimento e conclusão desta pesquisa científica.

Ao Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, pelo incentivo na constante busca pela atualização científica, desencadeando em mim o interesse, a persistência e a determinação no mundo da pesquisa.

Ao Dr. Juan Carlos Yugar Toledo, cardiologista especialista em ecocardiografia.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia Cardiovascular, Márcio Gonçalves, José Eduardo, Wladimir, Rita, Cene, Tavico, Ondina, Juan, Sílvia, Themys, Daise, Gisele e Valéria, pela colaboração e amizade.

Aos técnicos Gildo, José Ilton, Adilson, Joaquim, Evandro, pelo suporte técnico durante a pesquisa.

À secretaria do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Eduardo, Rita e Gislaine pela prestatividade e amizade, e, de modo especial, ao Wanderlei.

Às amigas Marcia Fornazim e Janaína Cardoso, pelas palavras de conforto e sugestões que serviram de incentivo para a continuidade desta pesquisa.

À Luciene Alves Moreira Marques, pela persistência e incentivo nos momentos de dificuldade. Muito obrigada.

À enfermeira Ana, do Setor de Hipertensão do Hospital das Clínicas da Unicamp, pelo auxílio prestado nesta pesquisa.

Ao biólogo Ronei L. Mamoni por auxiliar-me nas análises estatísticas deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Abigail Camargo pelo apoio, incentivo e sugestões durante a pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, por ter possibilitado a execução deste trabalho.

Aos docentes do Curso de Farmacologia do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pelo conhecimento compartilhado.

E a todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para que este trabalho fosse concluído, o meu muito obrigada.



	<i>PÁG.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxxiii</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<i>37</i>
1.1. Hipertensão arterial.....	<i>39</i>
1.2. Hipertensão refratária.....	<i>39</i>
1.3. Hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca.....	<i>42</i>
1.4. Disfunção endotelial.....	<i>43</i>
1.5. Hipertensão arterial e disfunção endotelial.....	<i>45</i>
1.6. Regulação endotelial da circulação.....	<i>45</i>
1.7. Vasodilatação mediada pelo fluxo.....	<i>48</i>
1.7.1. Vasoconstrição dependente do endotélio.....	<i>53</i>
1.7.2. Tromboxano A <sub>2</sub> .....	<i>53</i>
1.7.3. Relação entre alterações da reatividade vascular e mediadores vasoativos.....	<i>55</i>
1.8. Hipertensão arterial e remodelamento vascular.....	<i>55</i>
1.9. Endotélio e remodelamento vascular e miocárdico na hipertensão arterial.....	<i>55</i>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<i>57</i>
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<i>61</i>
3.1. Casuística.....	<i>63</i>
3.2. Métodos.....	<i>64</i>

3.2.1. Parâmetros avaliados.....	64
3.2.2. Drogas utilizadas.....	65
3.2.3. Hipertensão refratária – avaliação.....	65
3.2.4. Princípio do método.....	66
3.2.5. Determinação de nitritos e nitratos.....	66
3.2.6. Determinação de GMP cíclico.....	69
3.2.7. Determinação de Tromboxano B <sub>2</sub> .....	71
3.3. Aspectos éticos.....	73
3.3.1. Reembolso.....	73
3.3.2. Precauções especiais e critérios de exclusão.....	73
3.3.3. Riscos versus benefícios.....	73
3.3.4. Confidencialidade.....	74
3.3.5. Relatos de efeitos adversos durante o estudo.....	74
3.4. Análise estatística.....	74
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>93</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

$\mu\text{g}$	microgramas
$\mu\text{l}$ :	microlitros
5-HT	serotonina
AA	ácido araquidônico
ACh	acetilcolina
BK	bradicinina
Bpm:	batimentos por minuto
$\text{Ca}^+$	cálcio
Cmax:	concentração máxima atingida
CML:	célula do músculo liso
CMLV	célula do músculo liso vascular
$\text{C}^\circ$	graus <i>Celsius</i>
DP:	desvio-padrão
EDCF	fator constritor derivado do endotélio
EDRF	fator relaxante derivado do endotélio
EDTA:	ácido etil-diamino-tetra-acético
EIA :	ensaio imunoenzimático
ELISA:	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
EPM:	erro padrão da média
ET	endotelina
FC:	frequência cardíaca

Fig.:	figura
GMPC:	guanosina monofosfato cíclico
h:	hora
H <sub>2</sub> OMQ:	água miliquê
HAL :	hipertensão arterial leve
HAR:	hipertensão arterial resistente
HCl:	cloreto de sódio
HDL:	lipoproteína de alta densidade
HDRF:	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
HVE:	hipertrofia ventricular esquerda
ICC	insuficiência cardíaca crônica congestiva
IECA	enzima inibidora conversora de angiotensina
LDL:	lipoproteína de baixa densidade
LEI	lâmina elástica interna
MAPA:	monitorização ambulatorial de pressão arterial
ml:	mililitro
mmHg:	milímetro de mercúrio
MVE:	massa ventricular esquerda
N:	nitrogênio
NO:	óxido nítrico
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> :	nitratos / nitritos
Normot :	normotensos
NTG:	nitroglicerina
PAD :	pressão arterial diastólica

PAM :	pressão arterial média
PAS :	pressão arterial sistólica
PG:	prostaglandinas
Pg:	picograma
PGI <sub>2</sub> :	prostaciclina
PP:	pressão de pulso
PPM:	freqüência de pulso arterial
RPM:	rotações por minuto
TXA <sub>2</sub> :	tromboxano A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub> :	tromboxano B <sub>2</sub>
VD:	ventrículo direito
VE:	ventrículo esquerdo
VLDL:	lipoproteína de muito baixa densidade
vs:	<i>versus</i>
X:	média

***LISTA DE TABELAS***

---

	<b><i>PÁG.</i></b>
<b>Tabela 1:</b> Pressão de pulso, índice de massa de VE, fração de ejeção VE, e diâmetro de VE de Ctrl e HR.....	77

## *LISTA DE FIGURAS*

---

	<i>PÁG.</i>
Figura 1: Disfunção endotelial na HA.....	44
Figura 2: Representação esquemática da síntese de óxido nítrico.....	47
Figura 3: Ativação endotelial, bioquímica-biomecânica.....	49
Figura 4: Vasodilatação mediada pelo fluxo - resposta normal.....	51
Figura 5: Vasodilatação mediada pelo fluxo - resposta deprimida.....	52
Figura 6: Reação de Griess.....	68
Figura 7: ELISA - teste de competição: GMP livre e GMP rastreador.....	70
Figura 8: ELISA - teste de competição: TXB <sub>2</sub> livre e TXB <sub>2</sub> rastreador.....	72

## *LISTA DE GRÁFICOS*

---

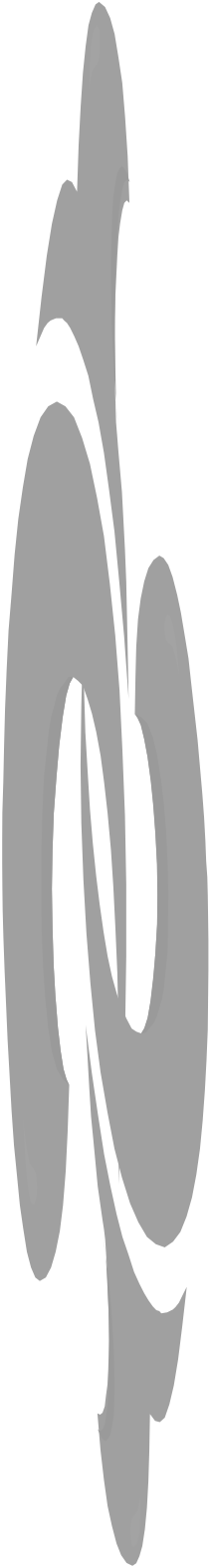
	<i>PÁG.</i>
<b>Gráfico 1:</b> Determinação de nitratos e nitritos.....	78
<b>Gráfico 2:</b> Determinação de GMPC.....	79
<b>Gráfico 3:</b> Determinação tromboxano B <sub>2</sub> .....	80
<b>Gráfico 4:</b> Determinação de pressão de pulso.....	81



## *LISTA DE DROGAS*

---

Acetato de metila	Merck S.A – Ind. Quím.- RJ, Brasil
Ácido acético	Sigma Chem.Co.(St.Louis,MO,USA)
Álcool etílico	LabSynth-Prod.p/ Laboratório Ltda, Brasil
Etanol 96%	Merck – Darmstadt - Alemanha
HCL	Merck S.A – Ind. Quím.- RJ, Brasil
Hexano	Mallinckrodt Chrom AR - USA
Metanol	Mallinckrodt Chrom AR – USA



## ***RESUMO***

É desconhecida a participação do endotélio na patogênese da hipertensão arterial HA resistente. Neste estudo, pacientes com HA diagnosticada como refratária ao tratamento foram encaminhados ao Ambulatório de Farmacologia Cardiovascular para confirmação diagnóstica baseada no seguinte método: monitorização arterial de pressão arterial por 24 horas (MAPA, sistema Space Labs – USA), antes e após a administração oral vigiada dos fármacos prescritos pelo médico assistente do paciente, na presença do pesquisador. Hipertensos leves/moderados foram utilizados como controles.

As alterações ocorridas no remodelamento vascular (em nível de vasos) foram obtidas pelo método ultrassonográfico. Através do ecocardiograma, foram estudadas as possíveis alterações a nível de miocárdio.

Selecionou-se 60 voluntários, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 60 anos alocados em grupos: 1) Controle (normotensos): n=15; 2) hipertensos leves: n=15 e 3) hipertensos refratários: n=15.

Pela manhã, em jejum, antes da administração das medicações rotineiramente ingeridas pelos pacientes, foram coletadas amostras de sangue venoso (10 ml/amostra) para realização de exames bioquímicos.

Todos os pacientes HAL e HR estavam devidamente medicados e controlados com as seguintes drogas anti-hipertensivas: Diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), antagonistas de angiotensina II, bloqueadores de canais de cálcio e  $\beta$ -bloqueadores.

Foram realizadas nestas amostras a quantificação de tromboxano B<sub>2</sub>, GMPc e nitratos e nitritos pelo método ELISA.

Análise de variância para medidas repetidas ou amostras independentes foram utilizadas para as variáveis descritas.

Os pacientes foram observados pelo período de 12 meses, com retorno ambulatorial a cada dois meses.

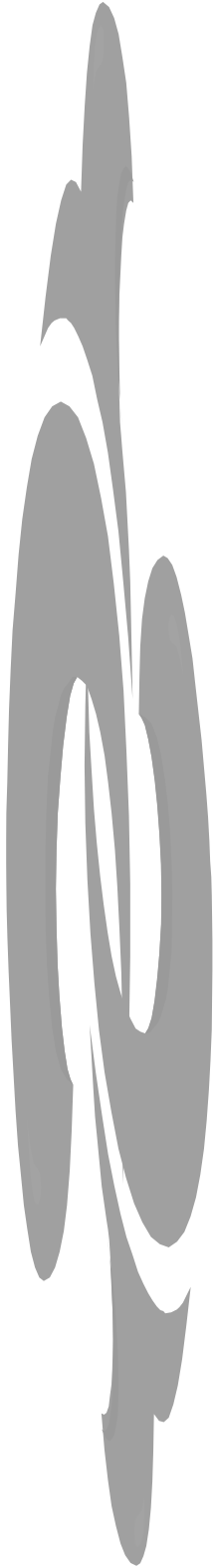
Verificou-se os seguintes resultados: a) a HVE no grupo HR demonstrou-se aumentada; b) o remodelamento também demonstrou-se aumentado; c) a determinação de tromboxano B<sub>2</sub>, GMPc e nitratos e nitritos foram similares nos três grupos estudados; d) a pressão de pulso teve aumento nos pacientes HR quando comparados com os demais grupos em estudo.

Observação: O grupo de pacientes HAL não apresentou resultados de ultrassonografia de carótidas e de ecocardiograma.

Não se observou correlação entre os marcadores bioquímicos endoteliais analisados e o remodelamento vascular / miocárdio em pacientes com HR.

Entretanto, verificou-se aumento considerável na pressão de pulso nos pacientes com HR quando comparados com os demais grupos em estudo.

Além disso, os pacientes HR tiveram massa do ventrículo esquerdo aumentada.



## ***1. INTRODUÇÃO***

## **1.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL**

A hipertensão arterial (HA) é o maior fator de risco independente relacionado à doença cardiovascular (MULTIPLE RISK FACTOR INTERVENTION TRIAL RESEARCH GROUP, 1990; KANNEL, 1993) por promover complicações diretas, as chamadas complicações mecânicas, que incluem o acidente vascular cerebral hemorrágico, a hipertrofia ventricular esquerda, a nefrosclerose e o aneurisma dissecante de aorta torácica, além de promover também complicações indiretas relacionadas à aterosclerose, responsável pela doença arterial coronariana obstrutiva, pela doença vascular cerebral isquêmica e pela doença arterial obstrutiva de carótidas e extremidades, responsáveis pela alta morbidade e mortalidade cardiovascular delas decorrentes. Tanto a hipertensão arterial sistólica como a diastólica, lábil ou fixa em qualquer faixa etária de ambos os sexos, está associada à elevada incidência de doença arterial coronariana: três vezes maior do que em adultos normotensos da mesma faixa etária (KANNEL, 1999).

## **1.2. HIPERTENSÃO REFRACTÁRIA**

O desenvolvimento da terapia anti-hipertensiva tem avançado muito nos últimos anos, mas, em alguns pacientes, a pressão arterial mantém-se elevada apesar da associação de várias medicações. Atualmente a hipertensão arterial refratária é definida como o estado hipertensivo resistente a pelo menos três diferentes drogas anti-hipertensivas que tenham diferentes mecanismos de ação, sendo uma diurética. Além disso, para se caracterizar um estado de refratariedade à terapêutica é necessário que se tenha certeza do grau de aderência ao tratamento, isto é, otimização destas drogas associadas.

As razões para uma resposta pobre à terapêutica são numerosas, estando, em geral, associadas (JOINT NATIONAL COMMITTEE, 1993) a:

- Não aderência ao tratamento
  - a. Custo da medicação
  - b. Instruções não claras ao paciente a respeito da medicação
  - c. Baixo nível educacional

- d. Efeitos colaterais da droga
- e. Posologia inconveniente
- Causas relacionadas ao fármaco
  - a. Doses muito baixas
  - b. Combinações inadequadas de drogas
  - c. metabolização e excreção rápida
  - d. Interações de drogas (anti inflamatórios não-esteroidais, contraceptivos orais, simpatomiméticos, antidepressivos, corticoesteróides, descongestionantes nasais, cocaína, ciclosporina e eritropoetina).
- Condições Associadas
  - a. Obesidade
  - b. Ingestão diária excessiva de álcool
- Hipertensão secundária
  - a. Insuficiência renal
  - b. Hipertensão renovascular
  - c. Feocromocitoma
  - d. Hiperaldosteronismo primário
- Sobrecarga de volume
  - a. Terapêutica inadequada com diuréticos
  - b. Excesso de ingestão de sal
  - c. Disfunção renal progressiva

- Pseudohipertensão (hipertensão do jaleco branco)

Em uma série de 91 pacientes nos quais a pressão arterial permanecia acima de 140/90 mmHg, apesar do uso de três agentes anti-hipertensivos, as causas encontradas foram: regime inadequado das drogas (43%), intolerância às medicações (22%), falta de aderência ao tratamento (10%) e hipertensão secundária (11%) (YAKOVLETVITCH & BLACK, 1991). Estudos mais recentes demonstraram a inconsistência do diagnóstico de refratariedade em muitos pacientes hipertensos, quando estes eram tratados com técnica cronoterapêutica, administrando-se as drogas anti-hipertensivas duas horas antes do mais alto valor de pressão arterial da manhã, tarde e/ou noite (CUGINI, 1997). Além disso, cerca de 50% dos pacientes com hipertensão resistente, deixam de ser considerados como tais, se as medidas de pressão arterial forem realizadas em ambiente não hospitalar (hipertensão do jaleco branco) (MEJIA, EGAN, SCHORK, ZWEIFLER, 1990). Finalmente, alguns autores preconizam que se o diagnóstico de hipertensão arterial refratária é real, a terapia deve incluir um diurético, um inibidor de enzima conversora de angiotensina e um bloqueador de canal de cálcio (PONTREMOLI, ROBAUDO, GAITER, 1991).

Nas últimas duas décadas, muitos são os estudos demonstrando os efeitos de drogas anti-hipertensivas, isoladas ou associadas, na HA refratária: felodipina (HERLITZ *et al.*, 1987), verapamil (GURGENIAN *et al.*, 1991), minoxidil+metildopa+clortalidona (COTORRUELO *et al.*, 1982), inibidores da monoaminoxidase (COLLIARD, 1981), captopril, furosemide (WHITE *et al.*, 1980), minoxidil+propranolol+furosemide (KLEINER *et al.*, 1987), entre inúmeras outras. É digno de nota, como drogas com mecanismos de ação tão diferentes foram capazes de normalizar a PA em pacientes tidos como portadores de HA refratária. Uma das explicações pode ser a não adoção de critérios rígidos para caracterizar HA refratária em muitos estudos ou até mesmo falhas metodológicas, como por exemplo a não padronização da técnica de medidas da PA. Estes artefatos na medida de pressão como possíveis causas de diagnósticos falsos de HA resistente foram estudados por MEJIA *et al.* (1990), que propuseram a medida de pressão intra-arterial em pacientes com hipertensão resistente, na ausência de hipertensão do jaleco branco e da hipertrofia do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma. Atualmente, duas técnicas isoladamente ou



associadas podem auxiliar no diagnóstico/tratamento de HA refratária: 1) a monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA) e 2) tratamento cronobioterapêutico (CUGINI, 1996; GANDIA, 1994). A cronobioterapia é baseada na modulação de doses farmacológicas e administração de drogas em função do momento de maior necessidade das mesmas. Assim, os anti-hipertensivos deveriam ser administrados duas horas antes da medida mais elevada da PA, na manhã, tarde e/ou noite. Isso implicaria em uma reformulação da definição de HA refratária: “Estado hipertensivo resistente a pelo menos três ou quatro drogas anti-hipertensivas, cada uma tendo um mecanismo de ação diferente, e administradas de acordo com critérios cronobioterapêuticos” (CUGINI, 1997). Entretanto, os critérios cronobioterápicos não são largamente utilizados na prática médica.

### **1.3. HIPERTENSÃO ARTERIAL E HIPERTROFIA CARDÍACA**

A sobrecarga pressórica decorrente da hipertensão arterial pode resultar na hipertrofia da musculatura do ventrículo esquerdo (HVE).

A HVE é a principal alteração cardíaca associada à hipertensão e representa fator de risco cardiovascular importante e independente da pressão arterial. O risco relaciona-se diretamente com a massa ventricular esquerda – MVE (CASALE & DEVEREUX, 1986)

O aumento progressivo da espessura parietal e da MVE é resultado direto da sobrecarga pressórica e do aumento do estresse parietal ventricular esquerdo, pela elevação da pressão arterial e da resistência periférica total.(FROHLICH, 1991; GROSSMAN, 1980).

Na fase inicial da hipertrofia, a espessura parietal ventricular aumenta devido à hipertrofia dos miócitos, por alinhamento paralelo dos sarcômeros, enquanto o diâmetro diastólico final do VE permanece inalterado, ou se reduz (ANVERSA, RICCI, OLIVETTI, 1986 ). Com isso, a relação entre a espessura parietal e o raio do ventrículo esquerdo aumenta e o estresse sistólico parietal, inicialmente elevado, retorna ao normal. Nessa fase, a HVE pode ser considerada adaptativa. Como o estresse parietal sistólico, que reflete a

pós-carga, é o principal determinante da função sistólica do VE e do consumo de oxigênio miocárdico, o desempenho do coração como bomba e o consumo de oxigênio por unidade de peso miocárdico, permanecem inalterados. Os índices de contratilidade isovolumétrica nesse estágio são normais.(STRAUER, 1979).

Contudo, o enchimento diastólico do VE é comprometido pelo processo de HVE. O simples espessamento parietal reduz a distensibilidade do VE, mesmo sem alterações das propriedades elásticas do miocárdio. Na curva pressão / volume do VE a pressão desvia-se para cima e o volume para a esquerda (GASSCH & LEVINE, 1976).

A HVE na hipertensão arterial caracteriza-se pela hipertrofia dos miócitos, e também pela ativação de outras células, como fibroblastos cardíacos, células musculares lisas e células endoteliais.

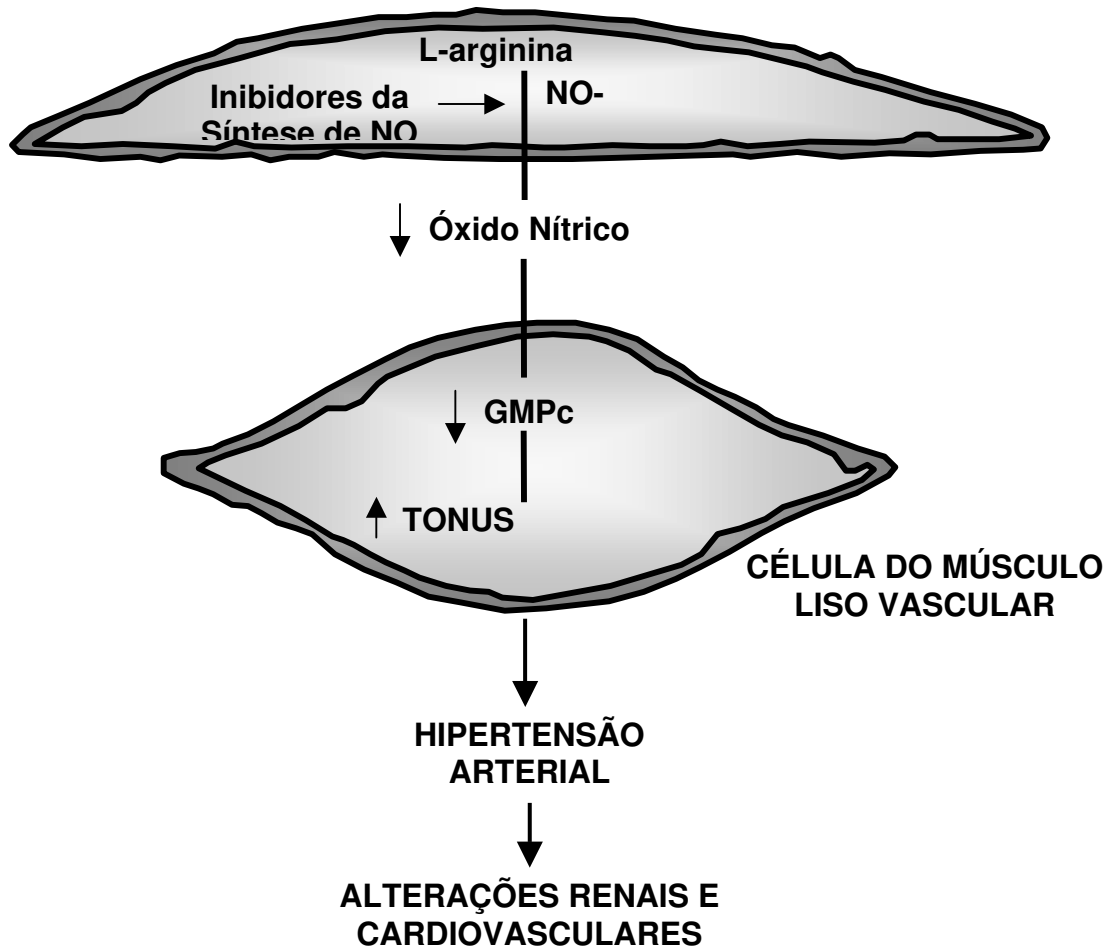
#### **1.4. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL**

As células endoteliais estão em disfunção em determinadas doenças como na hipertensão arterial. Tal disfunção é relatada como "alteração do relaxamento dependente do endotélio" (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980), causada principalmente por redução da liberação e/ou ação dos fatores dilatadores derivados do endotélio, podendo também ocorrer liberação de fatores constritores derivados do endotélio, o que conseqüentemente, contribui para disfunção endotelial.

Essa disfunção seria um marcador precoce da lesão e poderoso elemento na patogênese da aterosclerose (Fig.1). Porém, as recentes demonstrações da reversibilidade da disfunção endotelial indicam a possibilidade de sua interferência na progressão da doença e/ou no restabelecimento da função endotelial normal, reduzindo, então, o risco de eventos cardiovasculares (VITA *et al.*, 1990; BOULANGER, 1999; LI & FÖRSTERMANN, 2000).

## DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA HIPERTENSÃO ARTERIAL

# CÉLULA



**Figura 1:** Alteração no relaxamento dependente do endotélio por redução da liberação de fatores dilatadores derivados do endotélio.

## **1.5. HIPERTENSÃO ARTERIAL E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL**

Alterações morfológicas e funcionais nas células endoteliais ocorrem na hipertensão experimental (LÜSCHER & VANHOUTE, 1990) e, reduções da produção/liberação de óxido nítrico pelo endotélio podem ser tanto causa quanto consequência de hipertensão arterial (STAMLER *et al.*, 1994; HAYNES *et al.*, 1993).

Consistente com estudos animais, investigações clínicas demonstraram redução na resposta vasodilatadora na circulação do braço em pacientes hipertensos (LINDER *et al.*, 1990; PANZA *et al.*, 1990). Além disso, a produção basal de óxido nítrico parece estar diminuída em alguns, mas não todos os pacientes hipertensos (CALVER, COLLIER, VALLANCE, 1994; PANZA *et al.*, 1993). O efeito da acetilcolina não é alterado por L-NMMA em pacientes com hipertensão, indicando um defeito no sistema L-arginina/NO (PANZA *et al.*, 1993).

## **1.6. REGULAÇÃO ENDOTELIAL DA CIRCULAÇÃO**

O endotélio vascular constitui um verdadeiro órgão multifuncional essencial para a fisiologia vascular normal, e, quando se altera, passa a ser um fator crítico na fisiopatogenia da doença cardiovascular. (SIMONIESCU, 1986; VANE, ÄNGGARD, BOTTINE, 1990)

Os desajustes no delicado equilíbrio entre mecanismos que mantêm as condições fisiológicas da vasculatura podem ser resumidas da seguinte forma: 1) distúrbios hemodinâmicos, representados principalmente pelo "shear stress"; 2) regulação do tônus vascular por fatores vasoativos: vasodilatadores e vasoconstritores; 3) atividade proliferativa e anti proliferativa – remodelamento vascular; 4) alteração da atividade plaquetária; 5) "stress" oxidativo; 6) atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória; e 7) fatores hemostáticos e trombolíticos.

No futuro, com a ampliação de técnicas bioquímicas e da biologia molecular, poderemos ter acesso aos mecanismos ligados à atividade de sistemas enzimáticos (ECA) e à óxido nítrico sintase constitutiva endotelial (eNOS); ao estado funcional dos receptores; e

à transcrição gênica dentre outros (GIMBRONE, 1995; VANHOUTTE, PERRAULT, VILAINÉ, 1997).

O conceito de regulação endotelial do tono vascular foi introduzido por FURCHGOTT (1980, 1983), observando que a resposta à acetilcolina e outros antagonistas eram dependentes de um endotélio íntegro.

O mecanismo vasodilatador endotelial é mediado por substâncias vasoativas, principalmente pelo óxido nítrico (NO, antagonista fisiológico de substâncias vasoconstrictoras endógenas como catecolaminas, angiotensina II e endotelina 1), por prostaciclina, bradicinina, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e outros (VANE *et al.*, 1990; VANHOUTTE *et al.*, 1997; FURCHGOTT, 1983).

O NO difunde-se em direção às células musculares lisas vasculares e as relaxa pela estimulação da enzima citosólica guanilato ciclase solúvel, que leva ao aumento do GMPc. (RUBATTU, LEE-KIRSCK, DE PAOLI, GILIBERTI, GIGANTE, LOMBARDI, VOLPE, 1999). Com o aumento do GMPc diminui o influxo de cálcio para o citoplasma.

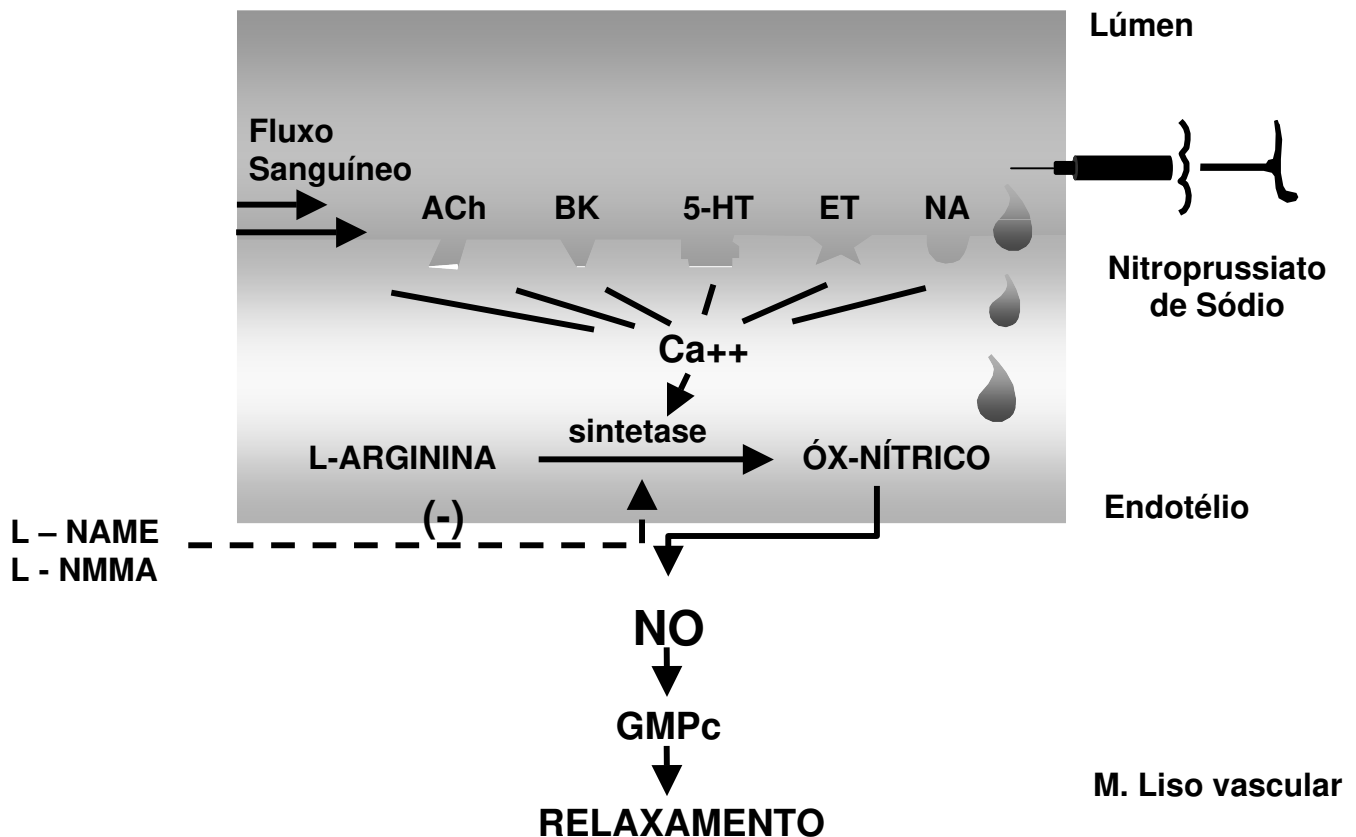
Assim, o NO pode causar relaxamento muscular por interação com canais de potássio, diretamente ou através do aumento de GMPc. O NO pode, ainda, regular o tono vascular através de interações complexas com a hemoglobina provenientes dos glóbulos vermelhos.

A produção de NO é o maior contribuinte do relaxamento dependente do endotélio, conseqüentemente os inibidores da eNOS causam vasoconstrição em muitos leitos vasculares e um aumento da pressão arterial sistêmica em animais e humanos (DATTILO & MAKHOUL, 1997; ZATZ & BAYLIS, 1998). Vide figura 2.

A liberação de NO é modulada por estímulos físicos e humorais, e somente o primeiro refere-se a estes estudos. Esses estímulos, principalmente o “shear stress”, força de cisalhamento produzida pelo atrito da onda de fluxo sanguíneo na parede arterial, considerado como um dos principais reguladores da liberação local de NO, indicam que a dilatação induzida pelo fluxo é dependente do endotélio (GIMBRONE, NAGEL, TOPPER, 1997; TRAUB & BERK, 1998).

## REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO

# SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO



Fonte: Laurindo, F.R.M et al., 1997.

**Figura 2:** A ativação de receptores: ACh, BK, 5-HT, ET e NA aumentam a concentração intracelular de  $Ca^{++}$  estimulam a NOS.

A NOS transforma a L-arginina em NO e difunde-se para CMLV, aumentando o GMPc, promovendo o relaxamento.

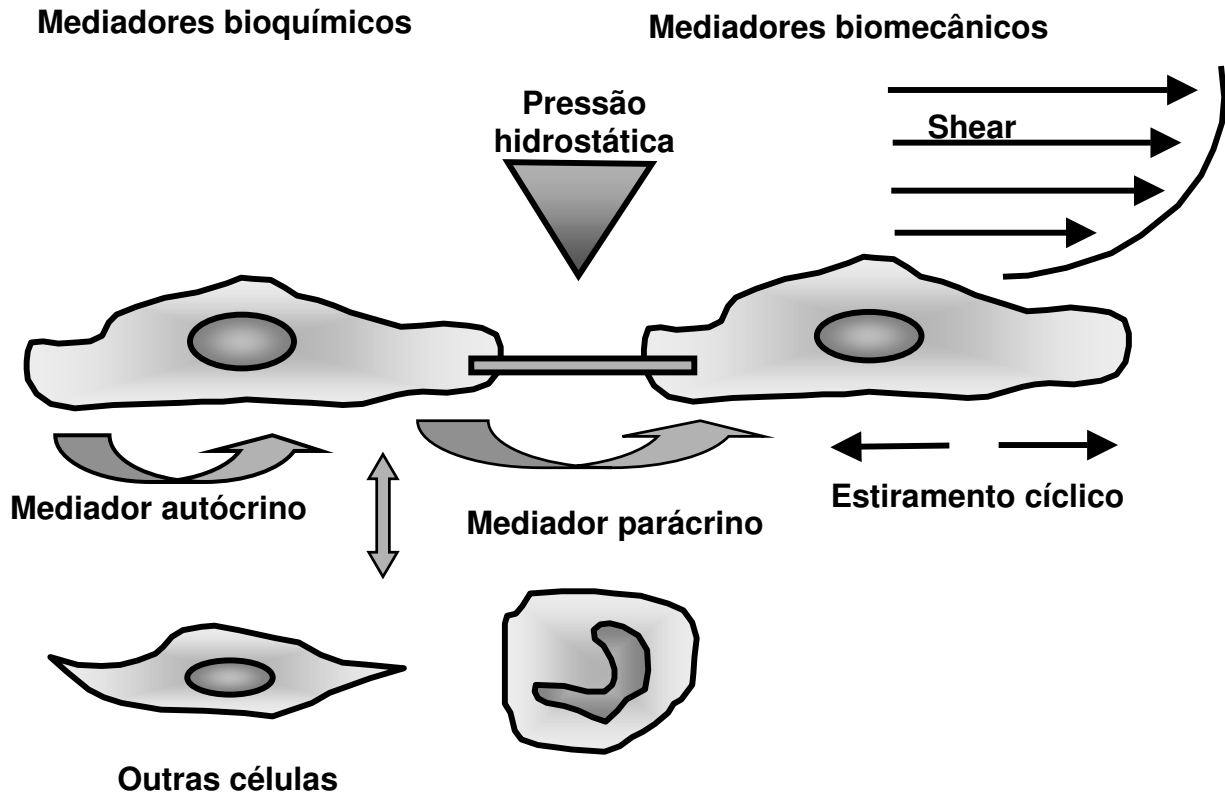
## 1.7. VASODILATAÇÃO MEDIADA PELO FLUXO

As células endoteliais têm uma grande importância na homeostase vascular, sendo responsáveis por várias funções sensoras e de integração de estímulos bioquímicos e biomecânicos. Alteram a função vascular através da secreção de mediadores protéicos e moleculares.

O endotélio possui a capacidade de detectar alterações das condições fisiológicas, quando exposto a elas e responde a fatores humorais e às condições mecânicas decorrentes do fluxo sanguíneo. Dentre elas, três forças mecânicas primárias são importantes para ativação das células endoteliais: a pressão intravascular, criada pela força de pressão hidrostática dentro do vaso; a tensão circunferencial, criada pelo estiramento das junções intercelulares exercidas sobre as células endoteliais; e o “shear stress”, ou, força de cisalhamento, criada pelo atrito da coluna sanguínea sobre a superfície endotelial. Essa última é a mais importante, pois estimula a liberação de substâncias vasoativas e promove alterações de expressão de genes envolvidos no metabolismo celular e alterações morfológicas (GOLIKORSKY *et al.*, 1994; LEVIN, 1995).

O “shear stress” é o mais potente estímulo fisiológico para a produção de óxido nítrico pela célula endotelial. Incrementos rápidos e agudos da produção de NO são secundários à ativação pós-translacional da eNOS, enquanto alterações crônicas estão relacionadas a alterações da expressão gênica da eNOS (Figura 3).

# Ativação Endotelial Bioquímica Biomecânica

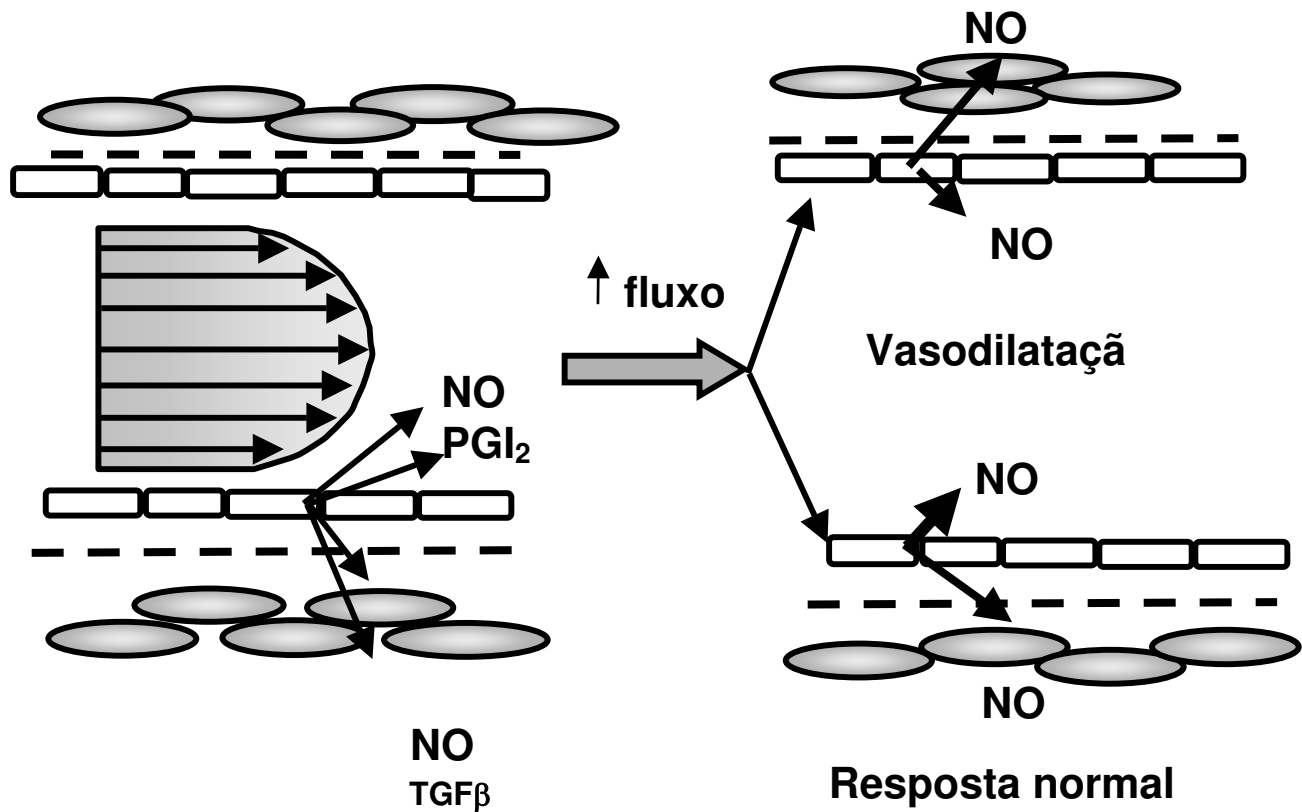


**Figura 3:** Esquema representativo da ativação endotelial por estímulos bioquímicos e biomecânicos: a ativação endotelial mediada por estímulos bioquímicos (catecolaminas, vasopressina, bradicinina, histamina, serotonina, adenosina difosfato [ADP] e trombina) e estímulos biomecânicos (pressão hidrostática, estiramento cíclico e “shear stress”).



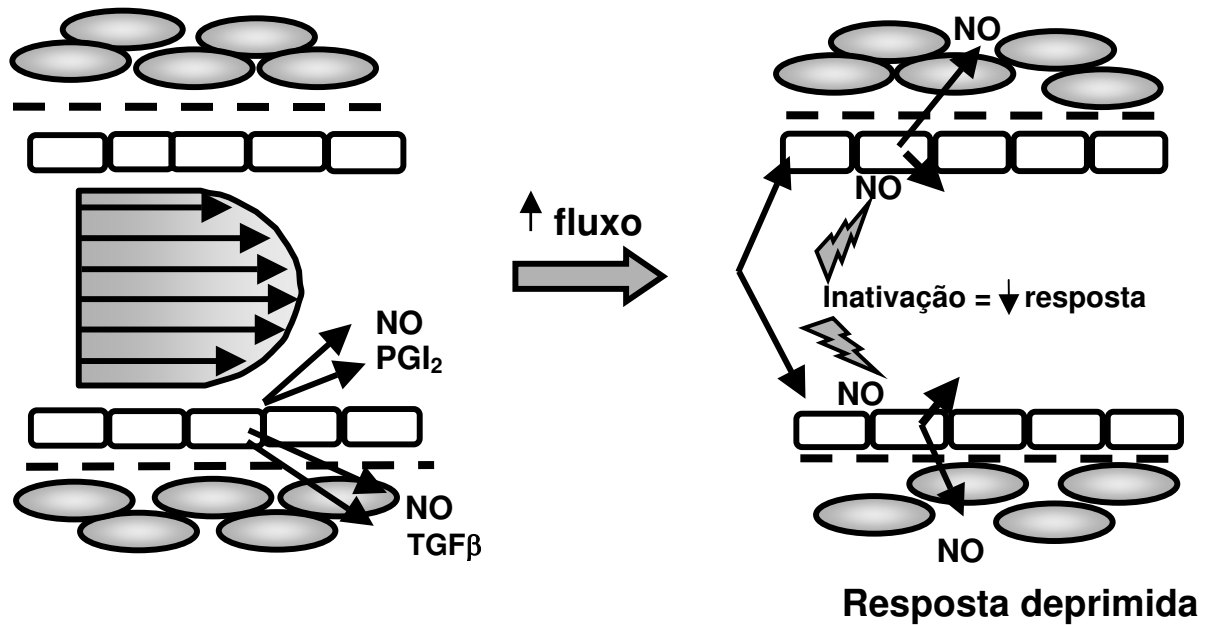
Dessa forma, o aumento de fluxo promove o aumento do "shear stress" na parede vascular, detectado por mecano-sensores endoteliais que, em artérias normais, levam à produção e liberação de substâncias vasodilatadoras pelo endotélio, como o NO. Assim, o aumento de fluxo pós hiperemia reativa promove dilatação da artéria em estudo (aumento do diâmetro, por exemplo, da artéria braquial, expressa em % de incremento do diâmetro em relação ao diâmetro basal), mediada pelo óxido nítrico, denominada dilatação dependente do endotélio (SINOWAY *et al.*,1989). A diminuição da dilatação dependente do endotélio é interpretada como alteração funcional da célula endotelial mediada pela via NO-GMP cíclico (Figuras 4 e 5).

# Vasodilatação mediada pelo fluxo



**Figura 4:** Esquema representativo da vasodilatação mediada pelo fluxo com resposta normal, promovida pelo aumento da síntese, liberação e biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) na camada muscular lisa vascular. E, endotélio; CMLV, célula muscular lisa vascular; LEI, lâmina elástica interna.

# Vasodilatação mediada pelo fluxo



**Figura 5:** Esquema representativo da vasodilatação mediada pelo fluxo com resposta deprimida, promovida pela diminuição da síntese, liberação e/ou biodisponibilidade (inativação) do óxido nítrico (NO) na camada muscular lisa vascular. E, endotélio; CMLV, célula muscular lisa vascular; LEI, lâmina elástica interna.

Em contrapartida, doadores de óxido nítrico como a nitroglicerina (NTG), agindo diretamente sobre a musculatura lisa vascular, promovem a dilatação não dependente do endotélio.

### **1.7.1. Vasoconstrição dependente do endotélio**

Células endoteliais também podem iniciar a contração da camada de células musculares lisas pela liberação de substâncias vasoconstritoras "fator constritor derivado do endotélio" (EDCF). Os EDCFs incluem o peptídeo endotelina-1, prostanóides vasoconstritores, como o tromboxano A<sub>2</sub> e prostaglandina H<sub>2</sub>, ou ainda ânions superóxidos e componentes do sistema renina-angiotensina.

### **1.7.2. Tromboxano A<sub>2</sub>**

Um grupo de fatores constritores derivados do endotélio é gerado pelo metabolismo do ácido araquidônico (AA) (HAMBERG, SVENSSON, SAMUELSSON, 1975). Nas veias periféricas, na circulação cerebral e em algumas artérias de animais hipertensos, a constrição dependente do endotélio é mediada pelo tromboxano A<sub>2</sub>, pela ativação do receptor tromboxano-endoperóxido (MEHTA & ROBERTS, 1983). Entre os estímulos que causam vasoconstrição dependente do endotélio, pode-se citar a resposta fisiológica ao estiramento circunferencial, iniciada pela distensão súbita da parede vascular, em resposta a um aumento da pressão sangüínea e a liberação de fatores vasoconstritores derivados do endotélio. Tais fatores, promovem a ativação da camada de células musculares lisas para restaurar a relação de fluxo normal (AUCH-SCHWELK, KATUSIC, VANHOUTTE, 1990; GE, HUGHES, JUNQUERO, 1995 ).

A avaliação do tono endotélio-dependente em pacientes hipertensos envolve diversos fatores como o óxido nítrico e o TXA<sub>2</sub>. Assim, considerando a hipótese do NO ou do TXB<sub>2</sub> estarem envolvidos na fisiopatologia da HR, quantificou-se em nível plasmático, três marcadores bioquímicos endoteliais a fim de investigar os estados hipertensivos, em nível circulatório, nos grupos experimentais estudados:

- $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  - (metabólitos do NO; capaz de representar um marcador de atividade da NO sintase e da produção de radicais livres);
- GMPc - segundo mediador de NO;
- $\text{TXB}_2$  - metabólito do  $\text{TXA}_2$ .

Porém, esta não parece ser a causa provável da elevação da pressão sanguínea, tendo em vista que os pacientes com HR não apresentaram correlação entre remodelamento cardiovascular e as quantificações plasmáticas dos marcadores bioquímicos endoteliais pesquisados na função endotelial.

## MÉTODO DE DIAGNÓSTICO

ELISA - ("Enzyme-linked Immunosorbent Assay")

O desenvolvimento do ELISA depende de quatro princípios:

a) Uma variedade de enzimas, incluindo peroxidase, fosfatase alcalina, urease,  $\beta$  galactosidase e penicilase G podem ser ligadas ao anticorpo ou antígeno sob condições que mantenham as propriedades biológicas (interação com substrato, ligação com antígeno, antigenicidade) de ambos os componentes do conjugado.

b) A maioria dos antígenos, como por exemplo, proteínas, peptídios, polissacarídeos e lipopolissacarídeos de bactérias, ligam-se espontaneamente às superfícies plásticas das microplacas de poliestireno. Uma vez ligados à superfície plástica, os antígenos ou anticorpos resistem a várias lavagens para remoção de material não ligado.

c) Em passos subsequentes, o imunocomplexo é formado, sendo o material não ligado removido por lavagem com tampão.

d) Uma enzima conjugada ao antígeno ou anticorpo quando ligada ao imunocomplexo fica disponível para interação com o substrato. A adição do substrato específico, resulta em uma mudança progressiva da cor da solução. Esta coloração pode ser comparada visualmente com padrões ou ainda pode-se fazer a determinação da densidade ótica (CLARK & ENGVALL, 1980).

### **1.7.3. Relação entre alterações da reatividade vascular e mediadores vasoativos**

Estudos relacionando alterações da vasodilatação mediada pelo fluxo aos níveis circulantes de substâncias vasoativas, ainda são inconclusivos. (SUNG *et al.*, 1997; HIGASHI *et al.*, 1998; MORENO JÚNIOR *et al.*, 1998; ANASTASIOU, MEGAS, ATHANASIOS, 1998).

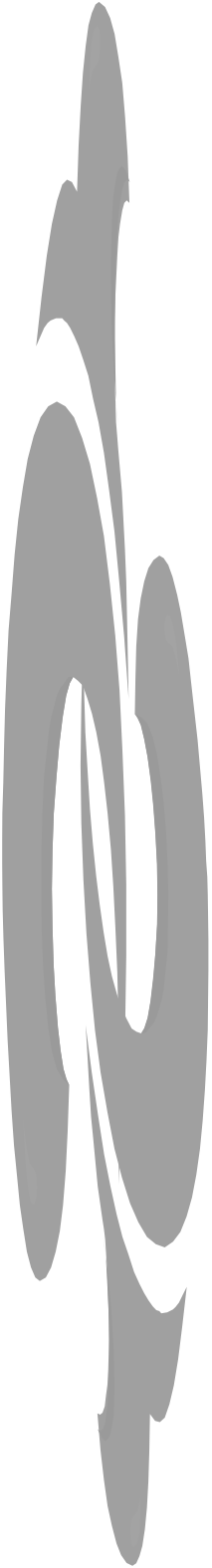
## **1.8. HIPERTENSÃO ARTERIAL E REMODELAMENTO VASCULAR**

A disfunção endotelial aparece no estágio precoce da insuficiência cardíaca congestiva crônica (ICC). Ambos os mecanismos dilatadores, endotélio-dependente e endotélio-independente, estão empareados em membros de vasos resistentes. Isso ocorre porque a função endotelial vascular, especialmente a produção de óxido nítrico (NO), é um importante fator na regulação da função vasodilatadora, bem como desempenha uma importante contribuição para a estrutura vascular. Estas observações sugerem que esses distúrbios são causados não somente por uma simples constrição do músculo vascular arterial, mas também por outras alterações relacionadas a uma possível disfunção endotelial.

O remodelamento vascular pode ser um importante mecanismo para compreender as falhas vasodilatatórias em ambos os membros, condutores e vasos dos músculos intraesqueléticos, podendo contribuir de maneira significativa para disfunção do ventrículo esquerdo e para pacientes com intolerância a exercícios devido à doenças cardíacas (NAKAMURA, 1999).

## **1.9. ENDOTÉLIO E REMODELAMENTO VASCULAR E MIOCÁRDICO NA HIPERTENSÃO ARTERIAL**

O remodelamento cardíaco e vascular decorrente da hipertensão é um processo dinâmico e complexo, envolvendo fatores mecânicos, moleculares, genéticos e bioquímicos. A massa ventricular esquerda, é determinada por múltiplos estímulos integrados, dentre os quais, a resistência à pressão mecânica imposta sobre o coração é fundamental.



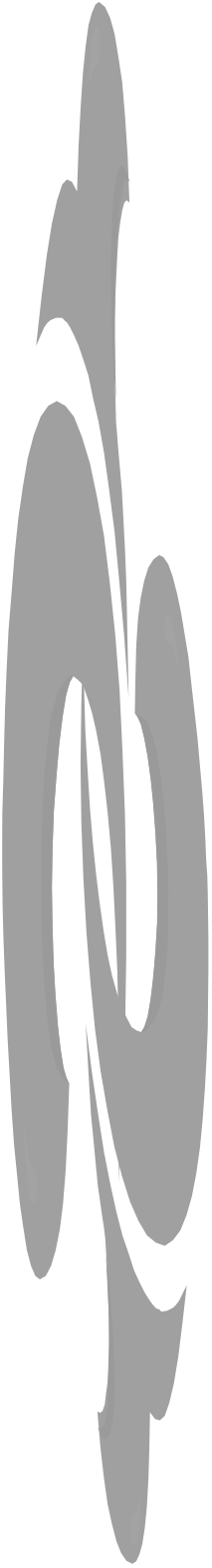
## ***2. OBJETIVOS***

Os objetivos deste trabalho foram:

- a. Investigar a participação do óxido nítrico e do tromboxano B<sub>2</sub> (metabólito do tromboxano A<sub>2</sub>) na gênese da hipertensão resistente;
- b. Determinar e comparar os níveis plasmáticos de nitritos e nitratos, GMP cíclico e tromboxano B<sub>2</sub> nos grupos de pacientes normotensos, hipertensos leves e hipertensos resistentes;
- c. Avaliar a massa de ventrículo esquerdo (MVE) em hipertensos resistentes a fim de determinar uma provável alteração na espessura de carótidas nesse grupo;
- d. Verificar a real participação do endotélio na modulação do tono vascular ;
- e. Analisar a adaptação do coração à sobrecarga hemodinâmica na hipertensão arterial, relacionada diretamente com a MVE.

Buscou-se, assim, estabelecer o comprometimento cardíaco e o remodelamento vascular-miocárdio entre hipertensos resistentes e normotensos.





### ***3. CASUÍSTICA E MÉTODOS***

### 3.1. CASUÍSTICA

Foram estudados 15 pacientes com hipertensão arterial caracterizada como refratária ao tratamento (Sixth Joint National Committee , 1997), com idade entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, que manifestaram interesse na investigação da causa da refratariedade da doença ao tratamento anti-hipertensivo. Após preencherem um questionário padrão para avaliação de fatores de risco para a doença arterial coronariana, foram extensivamente informados a respeito da natureza do estudo (Anexo 1).

Solicitou-se a esses pacientes que assinassem o termo de consentimento informado (Anexo 2), previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Anexo 3).

Todos os pacientes foram submetidos a exame físico completo, eletrocardiograma, e exames laboratoriais (hemograma completo com contagem de plaquetas, glicemia, uréia, creatinina, transaminases, potássio, colesterol total e frações, triglicérides, ácido úrico e sedimento urinário) antes de serem admitidos no estudo (Anexo 4).

Não receberam qualquer medicação nos sete dias que precederam o início do estudo (exceto anti hipertensivos). A ingestão de álcool e de produtos que contivessem cafeína não foi permitida nas 24 horas que antecederam os exames. Pacientes hipertensos leves (n=15) e indivíduos normotensos (n=15) foram considerados como controles, nas mesmas condições supra citadas.

Os pacientes com HR foram avaliados a cada dois meses por um período de 12 meses após a coleta das amostras.

Segundo os parâmetros clínicos (MAPA e pressão arterial sistêmica (mmHg, esfigmomanômetro de coluna de mercúrio)), foi confirmado o diagnóstico de hipertensão refratária, validando o grupo estudado.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Parâmetros avaliados

- a) Pressão arterial sistêmica (mmHg, esfigmomanômetro de coluna de mercúrio) para classificação dos voluntários hipertensos, quando da inclusão no estudo;
- b) Monitorização Ambulatorial de Pressão Arterial (MAPA).
  1. O comportamento da PA sistólica, diastólica e média (mmHg), bem como as respectivas variabilidades, nos períodos diurno e noturno;
  2. A queda fisiológica noturna da PA (mmHg);
  3. O comportamento da frequência cardíaca (FC, bpm) e variações da mesma;
  4. O comportamento da PA e FC de acordo com as atividades físicas dos voluntários;
  5. Ultrassonografia de Carótidas;
  6. Ecocardiograma Bidimensional com Doppler;
  7. Protocolo de pesquisa ultrassonográfica: o voluntário aprovado para participar do estudo ou seu representante legal, assinou o termo de consentimento anexo antes de iniciar o exame;
  8. Quantificação plasmática dos marcadores bioquímicos endoteliais (nitratos e nitritos, GMP cíclico e tromboxano B<sub>2</sub>).

O voluntário permaneceu em repouso por um período de 15 minutos em decúbito dorsal horizontal antes do início da avaliação. Foi realizado, então, um corte ultrassonográfico longitudinal da artéria braquial, o quadro central da artéria foi identificado claramente e as camadas íntimas anterior e posterior foram bem delimitadas. Os parâmetros de operação da máquina, uma vez regulados, não foram alterados durante o exame.

Etapa Basal: Mensuração do diâmetro da artéria braquial e quantificação do fluxograma "doppler" (quatro ciclos cardíacos), gravados em vídeo-cassete para posterior comparação com as mensurações feitas por um observador independente.

### **3.2.2. Drogas utilizadas**

Todos os portadores de HA resistente estavam em uso de:

- a. Diuréticos Tiazídicos
- b. IECA
- c. Antagonistas de Angiotensina II
- d. Bloqueadores de canais de cálcio

### **3.2.3. Hipertensão refratária - avaliação**

Protocolo de pesquisa -

Os voluntários foram acompanhados no ambulatório de Farmacologia Cardiovascular do HC da UNICAMP, após a confirmação do diagnóstico de hipertensão arterial refratária e após terem sido excluídos os portadores hipertensão secundária e pseudohipertensão. Uma hora antes e 24 horas após a ingestão da medicação habitual, já realizada monitorização da pressão arterial, através do sistema MAPA. Foi realizada coleta de sangue venoso (10 ml/amostra) em tubos contendo EDTA, utilizando-se "butterfly" n° 21, que foi inserido na veia superficial do braço esquerdo antes da administração das medicações rotineiramente ingeridas pelo pacientes.

Após centrifugação, as amostras de plasma foram congeladas a -20°C até o momento do uso. Nas amostras coletadas foram quantificados pelo método de ELISA (Cayman Chemical Co., USA):

- a. Nitritos / Nitratos (MUSCARÁ & DE NUCCI, 1996)
- b. Tromboxano B<sub>2</sub>
- c. GMP cíclico

### **3.2.4. Princípio do método**

O ensaio imunoenzimático é baseado na competição entre o mediador bioquímico livre (presente na amostra) e o conjugado à acetilcolinesterase (ACh) - rastreador - por um número limitado de sítios de ligação presentes em anticorpos de coelho, específicos para o mediador bioquímico quantificado. A concentração do rastreador é mantida constante enquanto a concentração desse mediador da amostra varia. A quantidade do rastreador capaz de ligar-se ao anti-soro de coelho será inversamente proporcional à concentração do mediador presente na amostra durante a incubação.

O anti-soro de coelho ligado ao mediador (tanto livre como conjugado à ACh) liga-se ao anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgE de coelho, previamente aderido à placa. Após lavagem para a remoção dos reagentes não ligados, a essa placa adiciona-se o reagente de Ellman's (que contém o substrato para ACh). O produto dessa reação enzimática de coloração amarela foi lido espectrofotometricamente em absorvância de 420 nm.

A intensidade da coloração determinada espectrofotometricamente em leitora de ELISA é proporcional à quantidade de rastreador, que é inversamente proporcional à quantidade do marcador bioquímico livre presente na amostra durante a incubação.

### **3.2.5. Determinação de nitritos e nitratos:**

Preparação das amostras -

Após a separação em coluna de troca aniônica (Spherisorb SAX, 250 x 4,6 mm, I.D, 5 µm), na qual duas reações seqüenciais ocorrem. A primeira envolve a redução de nitrato a nitrito através de uma coluna de cobre contendo cadmio. Na segunda, é feita a diazotização em ácido fosfórico 5% e a absorvância é lida a 540 nm.

As amostras foram diluídas e submetidas a procedimentos de purificação. Amostras de soro são desproteinizadas por ultrafiltração (filtros Millipore) através de membranas com massa molecular de corte de 3000 da.

#### Purificação das amostras -

As amostras de plasma foram purificadas em coluna de troca aniônica. O método tem sensibilidade de 30 pmol para ambos os ânions e a linearidade do método é observada até 60 nmol para cada ânion.

#### Quantificação de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> por ELISA -

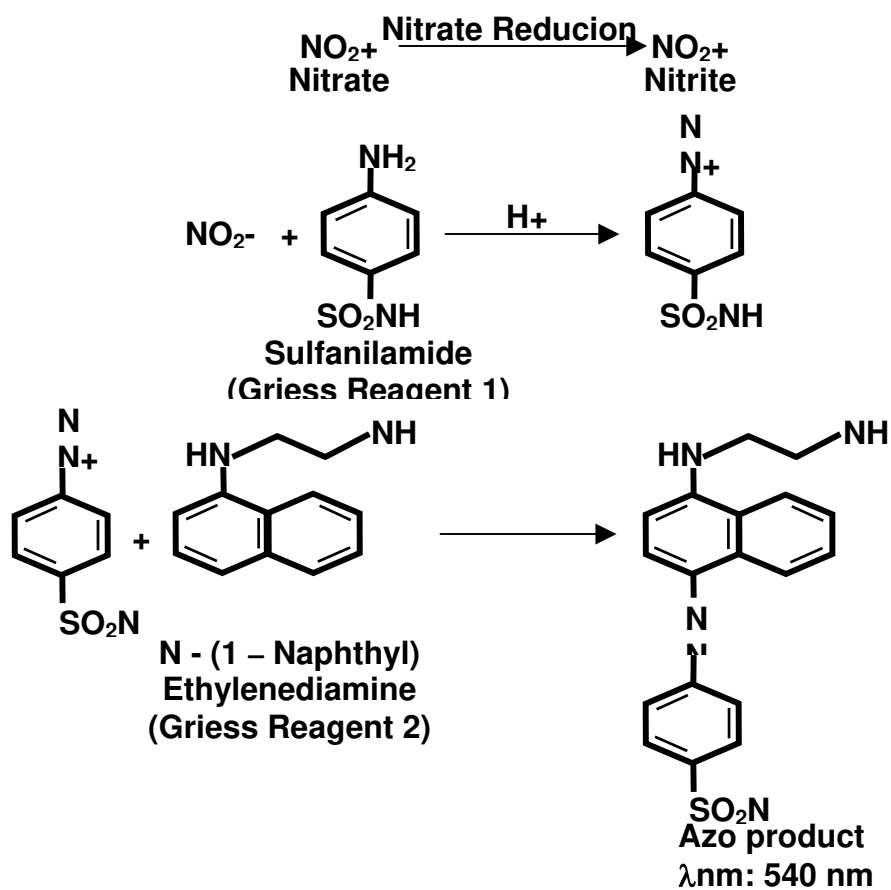
Os nitritos e nitratos são produtos finais estáveis da reação de NO com oxigênio molecular. A proporção de nitritos e nitratos é variável e não pode ser determinada exatamente. Portanto, o melhor indicador da produção de NO é a soma de nitritos e nitratos. O "kit" para determinação desses marcadores proporcionou um método acurado e conveniente para a medida da concentração total de nitritos e nitratos por meio de um simples processo, em duas etapas:

Primeira etapa - Determinação de nitritos pela reação de Griess (redução de nitrato a nitrito, por nitrato redutase) .

Segunda etapa - Para a quantificação de nitratos foi necessário a conversão enzimática prévia de nitratos em nitritos, e a determinação da concentração total de nitritos presentes na amostra. Subtraindo-se o valor da concentração de nitritos presentes na amostra, previamente quantificada, obteve-se a concentração de nitratos presentes.

# NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>

Figura: Chemistry of the Griess Reagents



Fonte: Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, U.S.A, 1992

Figura 6: Reação de Griess (redução de nitrato a nitrito)

### **3.2.6. Determinação de GMP cíclico**

Purificação das amostras -

As amostras de plasma foram extraídas com etanol e o sobrenadante foi evaporado a seco com jato de nitrogênio. A amostra seca foi reconstituída com solução tampão do "kit" de ensaio ELISA, e foi realizado seguindo as instruções do fabricante.

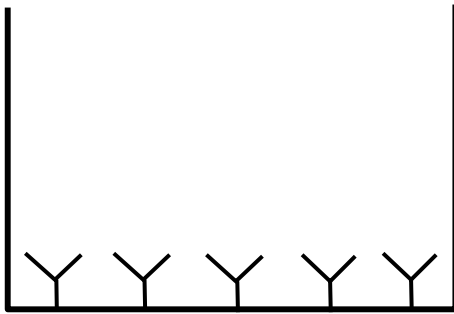
Realização do teste -

A partir desse ponto a técnica seguiu conforme descrito para detecção de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ , com exceção da reação de Griess.

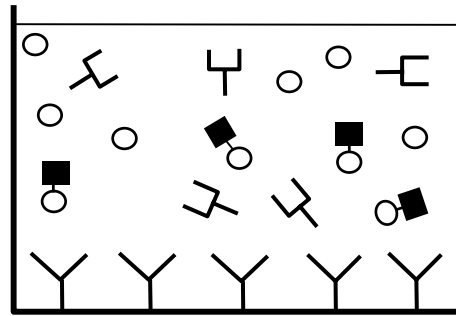
A intensidade da coloração foi proporcional ao resultado do GMPc rastreador, que é inversamente proporcional ao resultado do GMPc livre, presente na amostra durante a incubação.



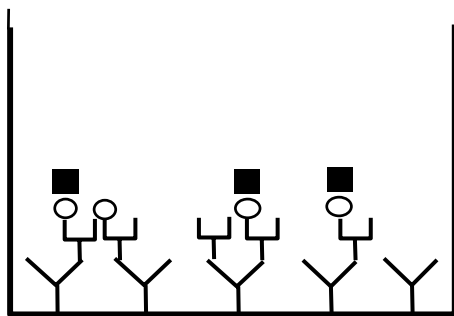
# GMPc



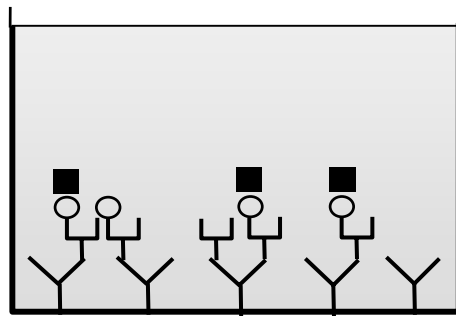
Plates are provided pre-coated with mouse monoclonal antibody and blocked with a proprietary formulation of blocking protein








- Add tracer, antiserum, and either standard or unknown sample to well and incubate



- Wash to remove all unbound reagents



- Develop the well with Eliman's Reagent

-  Mouse Monoclonal Antibody
-  Blocking
-  Acetylcholinesterase Linked to cGMP (Tracer)
-  Specific Antiserum to
-  Free

Fonte: Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, U.S.A, 1992

**Figura 7:** ELISA (teste de competição): GMP livre e GMP rastreador

### 3.2.7. Determinação plasmática de TXB<sub>2</sub>

Purificação das amostras -

A amostras do plasma foram purificadas usando-se colunas de fase reversa C<sub>18</sub> (Waters Co., Milford, MA, USA), e os níveis plasmáticos de TXB<sub>2</sub> (metabólito do TXA<sub>2</sub>) foram determinados por teste imunoenzimático - ELISA.

Preparação dos reagentes -

Todos os reagentes foram mantidos à temperatura ambiente antes do início da reação.

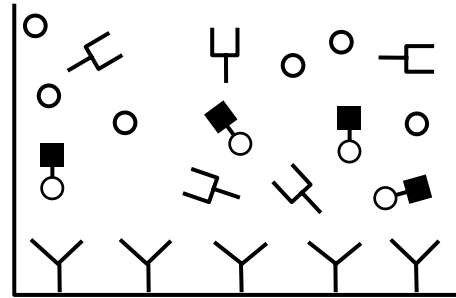
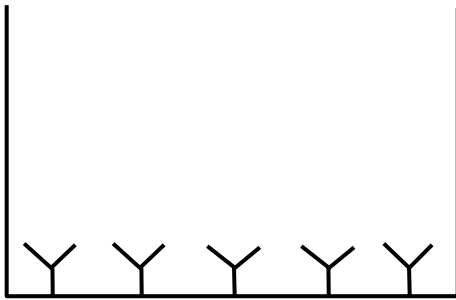
Os tampões de diluição e lavagem foram preparados segundo as instruções do "kit". A curva padrão, com oito pontos, foi realizada a partir do padrão (10 ng/ml a 0.075 ng/ml).

Realização do teste -

A partir desse ponto a técnica seguiu conforme descrito para detecção de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, com exceção da reação de Griess.

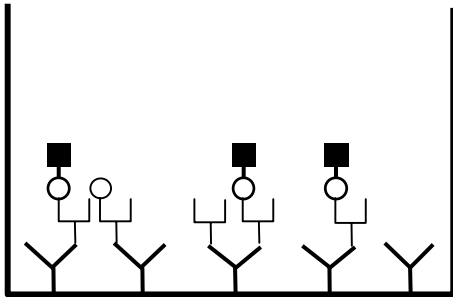
A intensidade da coloração foi proporcional ao resultado do TXB<sub>2</sub> rastreador, que é inversamente proporcional ao resultado do TXB<sub>2</sub> livre, presente na amostra durante a incubação.

# Tromboxano B<sub>2</sub>

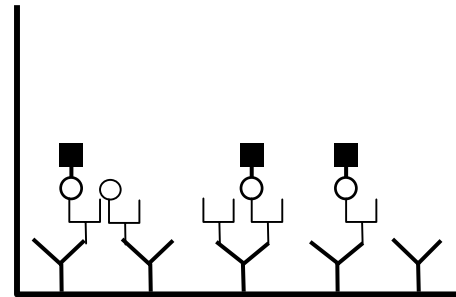


Plates are provided pre-coated with mouse monoclonal antibody and blocked with a proprietary formulation of blocking protein

- Add tracer, antiserum, and either standard or unknown sample to well and incubate



- Wash to remove all unbound reagents



- Develop the well with Elman's Reagent

- Y Mouse Monoclonal Antibody
- Blocking
- Acetylcholinesterase Linked to TXB<sub>2</sub> (Tracer)
- └ Specific Antiserum to
- Free TXB<sub>2</sub>

Fonte: Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, U.S.A, 1992

**Figura 8:** ELISA (teste de competição): TXB<sub>2</sub> livre e TXB<sub>2</sub> rastreador

### **3.3. ASPECTOS ÉTICOS**

#### **3.3.1. Reembolso**

Os voluntários receberam R\$ 20,00 (vinte reais) referentes a cada período de quatro a seis horas de permanência no hospital e pelo retorno após 24 horas a título de reembolso pelo gasto dispendido, desconforto causado e gastos com transporte.

#### **3.3.2. Precauções especiais e critérios de exclusão**

Apesar de ser responsabilidade do médico que acompanha e encaminha o paciente para este estudo, mulheres foram incluídas no estudo apenas se estivessem utilizando algum método contraceptivo eficaz (DIU ou contraceptivos orais) ou se tivessem sido submetidas previamente a procedimento cirúrgico para esterilização. Também pacientes com anemia de qualquer grau e origem e portadores de distúrbios psiquiátricos não foram incluídos neste estudo.

Não houve qualquer desconforto relatado pelo voluntário, relacionado ou não com a administração de suas medicações de rotina.

#### **3.3.3. Riscos *versus* benefícios**

O risco deste estudo estava relacionado apenas à venóclise em membro superior e à retirada de sangue, e é, portanto, muito baixo. Entretanto, pequenos hematomas locais poderiam ocorrer. A incidência de infecções no local de venóclise foi muito baixa. As drogas e doses administradas corresponderam às mesmas prescritas e referidas como corretamente ingeridas pelo paciente nos últimos 14 dias.

Os voluntários foram beneficiados diretamente com a realização deste estudo, pois tiveram condições de conhecer o comportamento dos níveis de sua pressão arterial, frente à(s) medicação(ões) rotineiramente utilizadas, através de sistemas não invasivos (MAPA-24 horas e *Portapres* batimento-à-batimento).

Além disso, foram submetidos à consulta médica, eletrocardiograma e exames de laboratório gratuitamente, caso não apresentassem exames recentes.

#### **3.3.4. Confidencialidade**

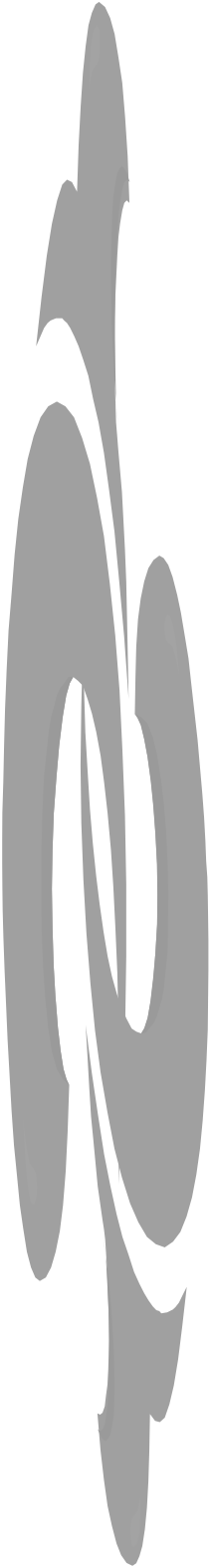
Nenhuma informação ou resultado foram divulgados sem o consentimento escrito do indivíduo, exceto por solicitação de órgãos governamentais ligados à supervisão de pesquisa clínica no país. Caso o paciente solicitasse o resultado da resposta pressórica à terapêutica avaliada, seria encaminhada por escrito, de forma confidencial, ao médico que o assistiu.

#### **3.3.5. Relatos de efeitos adversos durante o estudo**

Não foram observados efeitos adversos no decorrer do estudo.

### **3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. A análise de variância para medidas repetidas ou amostras independentes foi utilizada para a análise das variáveis, conforme a natureza da comparação (intra ou intergrupos).



## ***4. RESULTADOS***

Através do ecocardiograma verificamos HVE (alteração a nível do miocárdio) em pacientes HR. A ecocardiografia tem sido usada para avaliação indireta da disfunção endotelial em pacientes hipertensos.

Com o objetivo de avaliar alteração em nível dos vasos (remodelamento vascular), utilizou-se o método de ultrassonografia de carótidas, pelo qual pôde-se observar seu aumento em paciente HR. As características clínicas dos grupos estudados encontram-se expressadas na Tabela 1.

Encontramos níveis plasmáticos inalterados nos marcadores bioquímicos endoteliais quantificados em pacientes HR.

Não houve correlação entre os marcadores bioquímicos endoteliais e o remodelamento vascular / miocárdio em pacientes HR (Gráficos 1, 2 e 3).

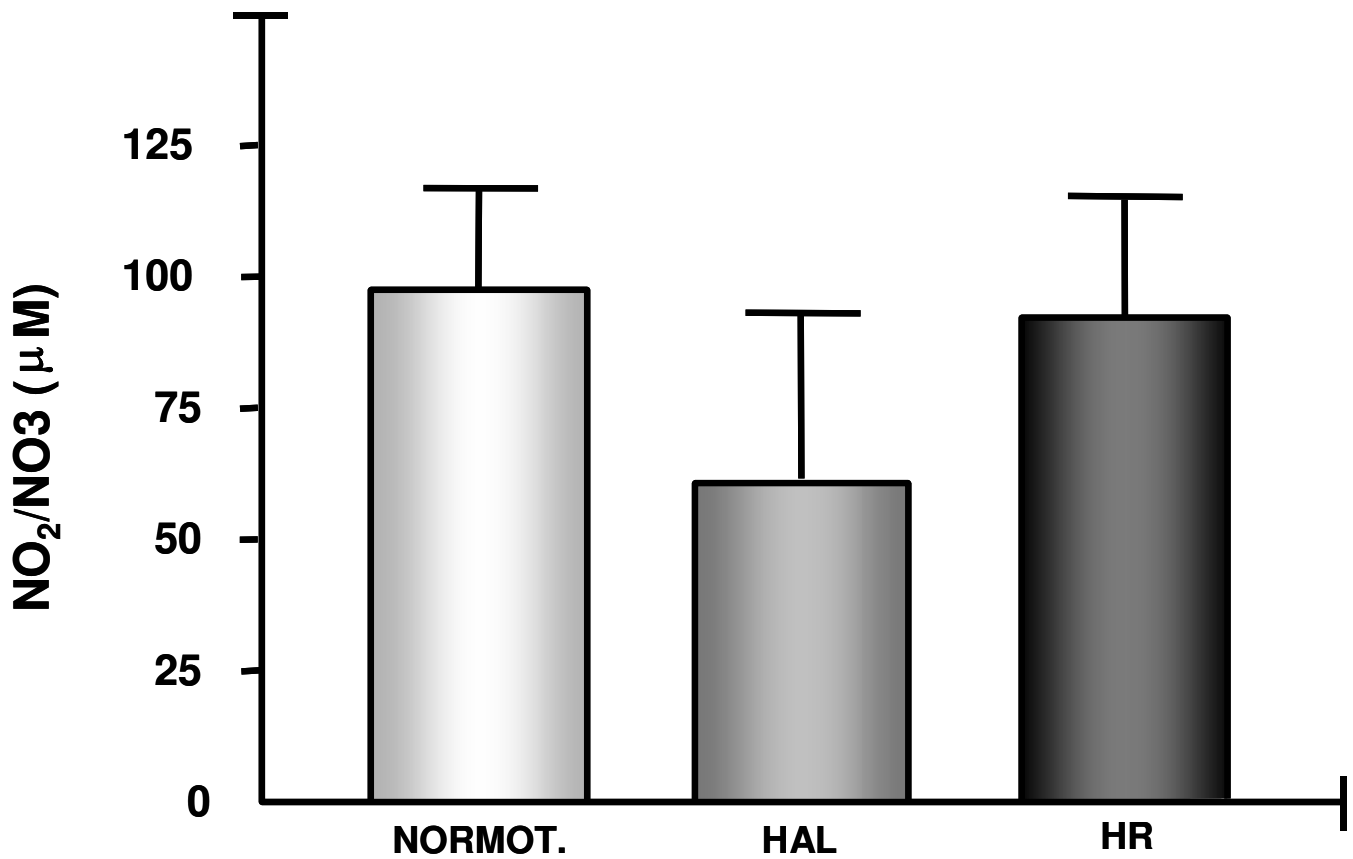
O aumento da pressão de pulso em pacientes HR provavelmente é consequência de fatores biomecânicos (Gráfico 4).

**Tabela 1:** Pressão de pulso (PP), índice de massa ventricular esquerda (IMVE), fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE) e diâmetro VE no grupo Controle (Normotensos) e grupo hipertensos refratários (HR).

	NORMOTENSOS	
	(n=15)	HR (n=15)
<b>PP (mmHg)</b>	46.0±10.04	61.2±9.08*
<b>Índice de Massa VE (g/m<sup>2</sup>)</b>	108.3±17.3	138.3±19.8*
<b>Fração de Ejeção VE (%)</b>	69.2±4.0	67.3±5.0
<b>Diâmetro VE (mm)</b>	1.04±0.14	1.59±0.22*

\*P< 0.001

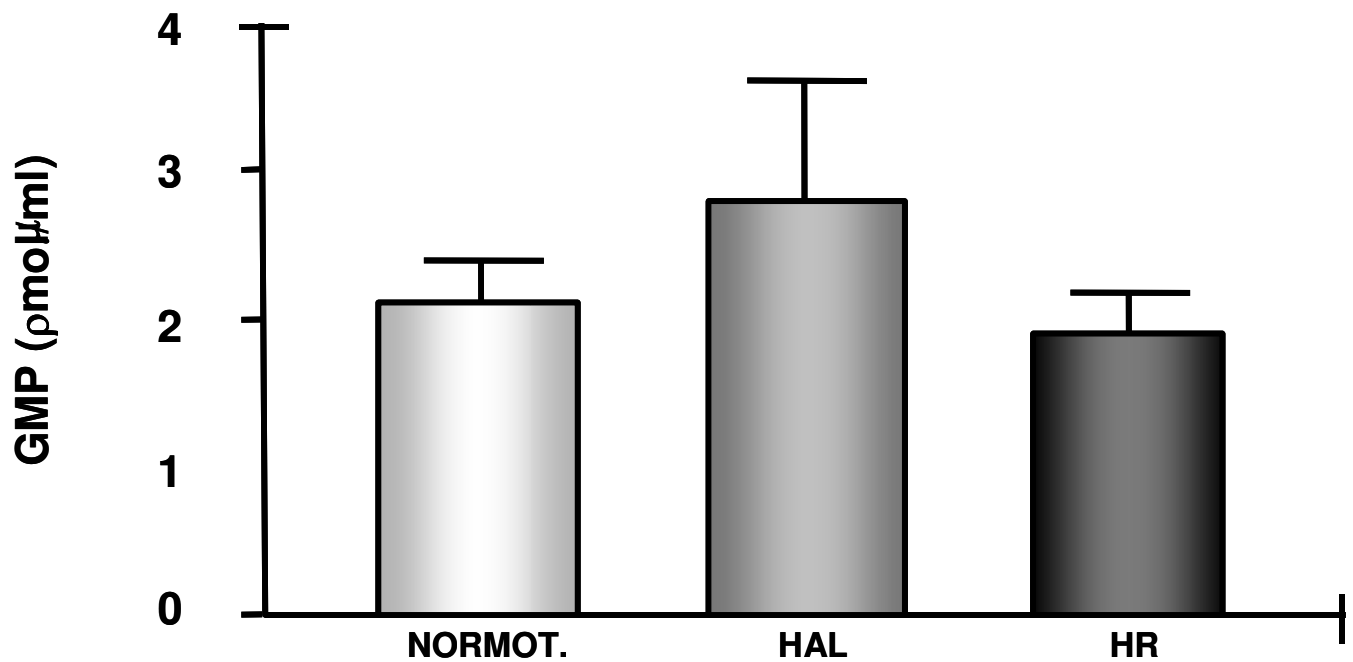
Valores foram expressos em média ± DP.



**Gráfico 1:** Determinação de nitratos e nitritos no plasma de pacientes com hipertensão arterial leve (HAL), hipertensão arterial resistente (HAR) e em indivíduos normotensos (Controle), pelo método ELISA.

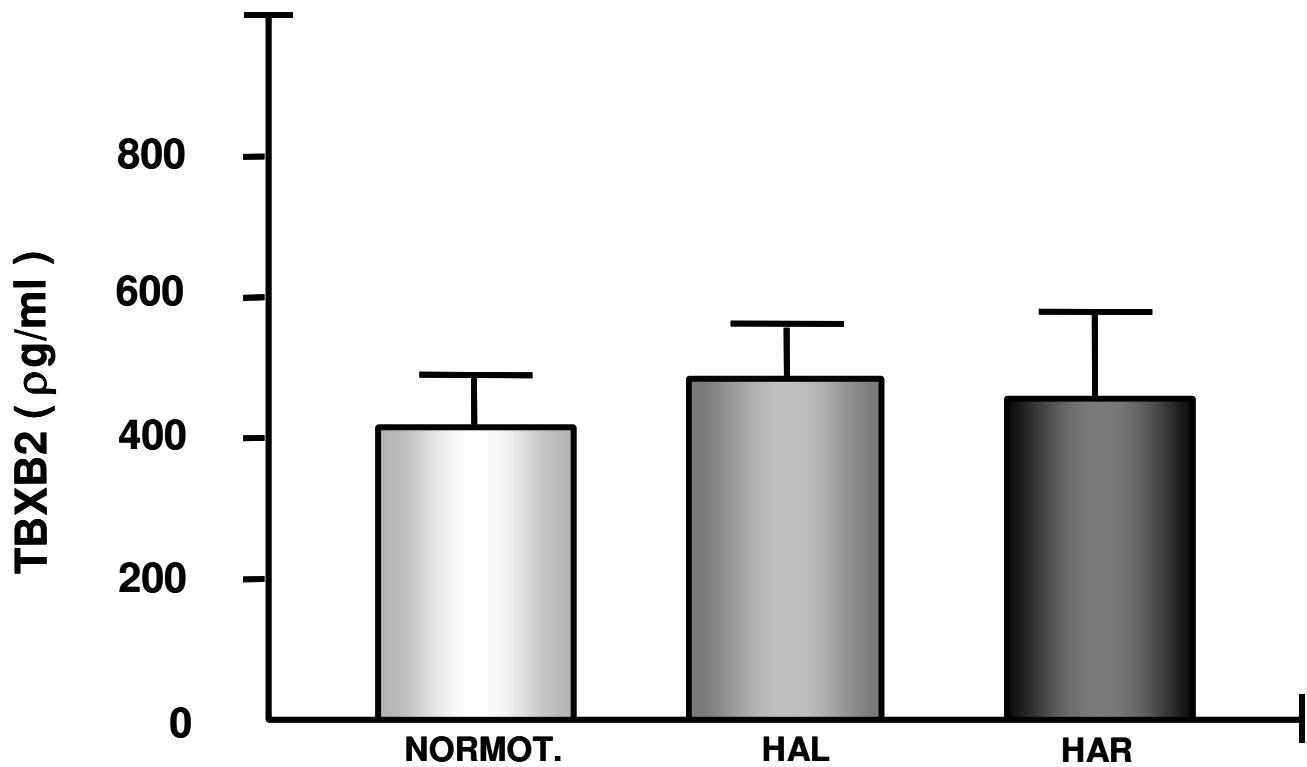
Os resultados foram expressos como média ± EP.





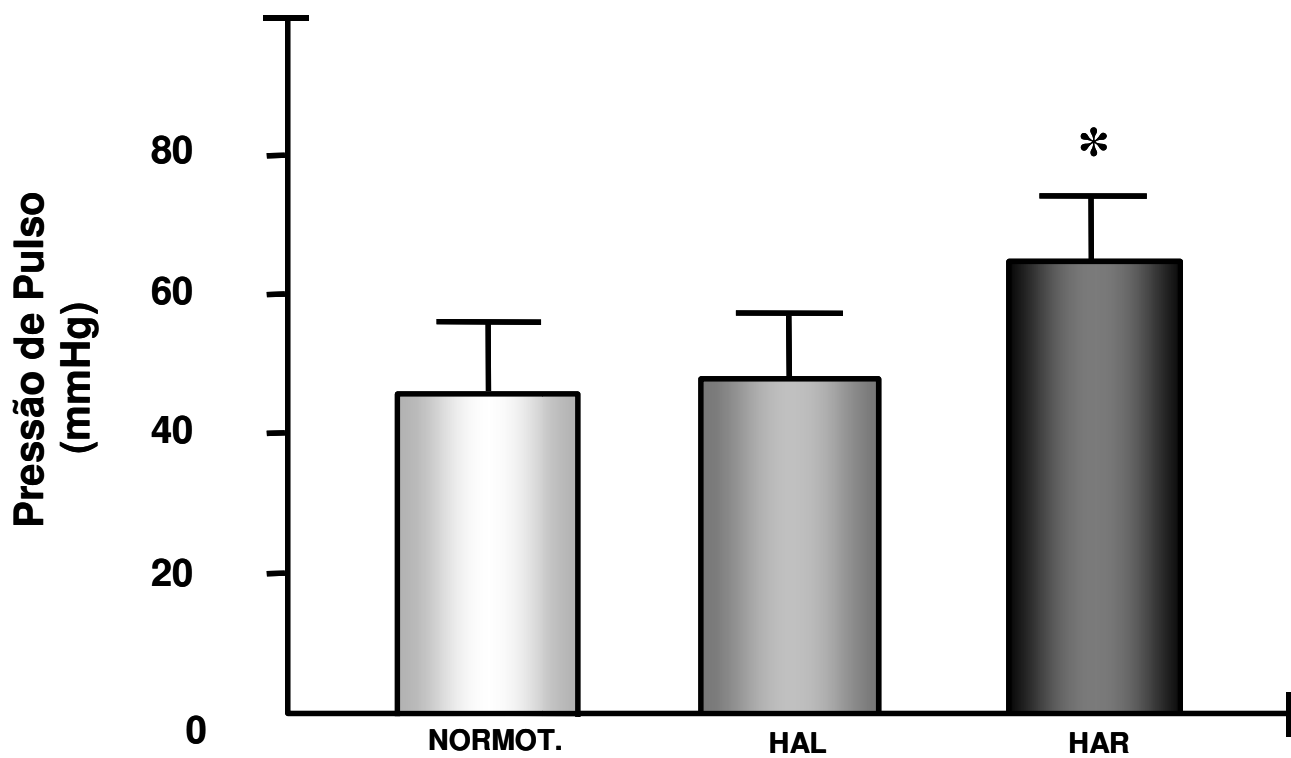
**Gráfico 2:** Determinação de GMPc no plasma de pacientes com hipertensão arterial leve (HAL), hipertensão arterial resistente (HAR) e em indivíduos normotensos (Controle), pelo método ELISA.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EP.



**Gráfico 3:** Determinação de tromboxano B<sub>2</sub> no plasma de pacientes com hipertensão arterial leve (HAL), hipertensão arterial resistente (HAR) e em indivíduos normotensos (Controle), pelo método ELISA.

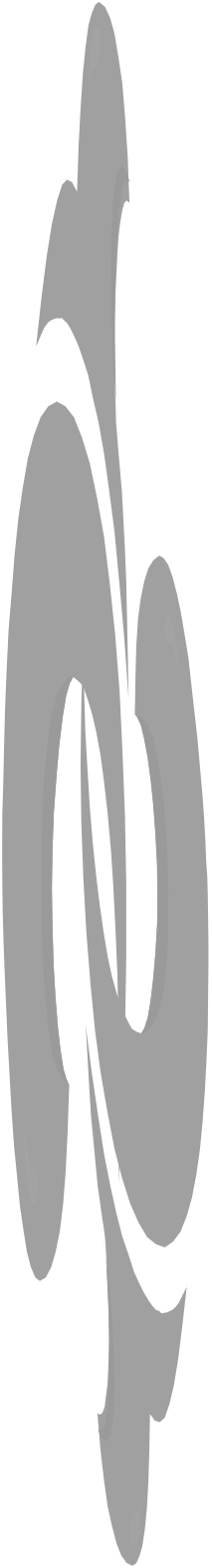
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EP.



\*  $P < 0.001$

**Gráfico 4:** Determinação de pressão de pulso

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EP.



## ***5. DISCUSSÃO***

Os principais resultados do presente estudo foram: 1) A pressão de pulso e as medidas do diâmetro (espessuras) das carótidas estavam aumentadas nos pacientes com hipertensão refratária (HR); 2) As concentrações plasmáticas de nitrato e nitrito, GMPc e tromboxano B<sub>2</sub> foram similares nos três grupos experimentais pelo método ELISA. Neste estudo procurou-se esclarecer a probabilidade do NO e o TXB<sub>2</sub> estarem envolvidos na fisiopatologia da HR. A respeito do GMPc, esses resultados similares reforçam a idéia de que a diminuição da vasodilatação dependente do endotélio é causada pela redução da biodisponibilidade de NO (TADEI *et al.*, 1997). Entretanto, valores similares de tromboxano B<sub>2</sub> nos grupos observados, provavelmente refletem limitações metodológicas de simples dosagens em níveis plasmáticos (DOTEVALL *et al.*, 1992). Essas observações reforçam o papel dos radicais livres de oxigênio como agentes causadores da disfunção endotelial e da diminuição dos produtos finais no metabolismo do NO (M<sub>C</sub>VEIGHT, LEMAY, MORGAN, COHN, 1996). Futuros estudos serão necessários para melhor compreensão acerca da biodisponibilidade de NO em hipertensos resistentes.

TADEI *et al.* (1997), assevera que modificações do "shear stress" e as oscilações da pressão de pulso, promovem alterações bioquímicas da via L-arginina-NO e da via dependente da atividade da ciclooxigenase, da atividade pró-inflamatória e da proliferação das células musculares lisas (MONCADA & HIGGS, 1993).

Apesar da maior severidade dos fatores de risco presentes nos pacientes envolvidos nesse estudo, os resultados da vasodilatação dependente do endotélio foram semelhantes entre os grupos estudados (HIGASHI *et al.*, 1998). Entretanto, a vasodilatação não dependente do endotélio está diminuída em hipertensos não controlados (TOLEDO, 2000).

O remodelamento cardíaco e vascular para a hipertensão é um processo dinâmico e complexo, envolvendo fatores bioquímicos, mecânicos, moleculares e genéticos.

O processo adaptativo do coração, devido à sobrecarga hemodinâmica na hipertensão arterial, relaciona-se diretamente com a massa ventricular esquerda aumentada, (HUGHES *et al.*, 1993), servindo então, como um mecanismo de adaptação para

normalizar a parede estressada (MITCHELL, PFEFFER, PFEFFER, 1997; WENDELHAG *et al.*, 1991). A massa ventricular esquerda é determinada por múltiplos estímulos de sinais integrados, fundamentalmente, à resistência mecânica imposta sobre o coração. A ecocardiografia (TICE *et al.*, 1996), os sistemas de monitoramento BP (GROSSMAN, JONES, MCLAURIN, 1975), e a técnica da dilatação mediada pelo fluxo, têm sido usadas como instrumento de avaliação indireta (não invasiva) da disfunção endotelial em pacientes hipertensos (STERGIOPULOS & WESTERHOF, 1988).

A complacência arterial total e a resistência periférica foram importantes para nos mostrar que são somente dois importantes parâmetros arteriais determinando a pressão de pulso aórtica (CUSPIDI *et al.*, 1992; ROMAN *et al.*, 1995), a qual reflete uma predisposição marcante de doença cardíaca coronariana e mortalidade cardiovascular (CUSPIDI *et al.*, 1996; ROMAN *et al.*, 1996). Neste estudo verificou-se que a pressão de pulso esteve aumentada em hipertensos resistentes, quando comparada aos controles normotensos.

Na hipertensão, os resultados da curva BP (somatória de um componente constante), da medida de pressão arterial (MAPA), e um componente pulsátil (PP), contribuíram relativamente influenciando, de maneira significativa pela idade e pelo nível de pressão arterial, uma das maiores determinantes de PP.

Em indivíduos jovens a carótida isobárica e a rigidez aórtica foram semelhantes quando comparadas aos controles normotensos; associação a qual foi proporcional ao aumento de MAPA e PP. Em outras faixas etárias a carótida isobárica e a rigidez aórtica foram reduzidas, indicando alterações de pressão-independente da tenacidade da parede (BAGUET *et al.*, 2000). Esse aumento desproporcional aumenta a PP acima do MAPA, mas não aumenta o volume de derrame (movimento rítmico). Esse padrão hemodinâmico foi considerado como uma conseqüência direta dos danos estruturais na parede aórtica (BAGUET *et al.*, 2000). Entretanto, a administração aguda de nitroprussiato de sódio em doadores exógenos de óxido nítrico foi capaz de reverter o aumento da PP (MUIESAN *et al.*, 1996). Concluiu-se, então, que os danos independem da estrutura vascular.

Dessa forma, a disfunção endotelial desempenha um papel importante nas alterações presentes dependentes-NO e como agente vasomotor, responsáveis pelo aumento no mecanismo da tenacidade aórtica e na PP (KHATTAR *et al.*, 1997; JIA & FURCHGOTT, 1993).

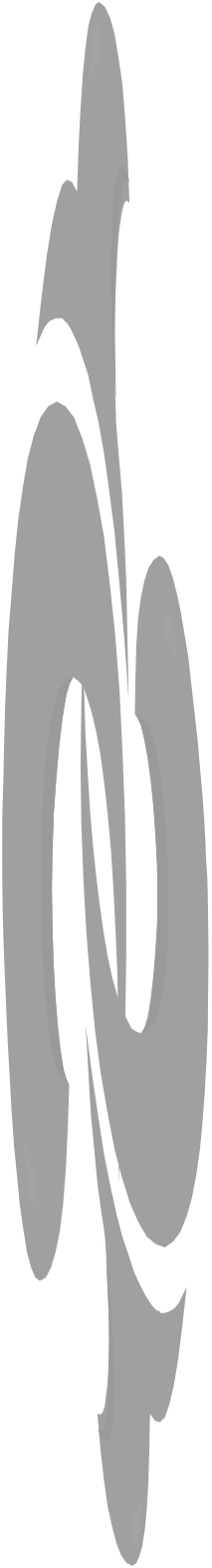
Nas duas últimas décadas tem-se observado um avanço nos conhecimentos acerca do papel fisiológico das substâncias vasoativas derivadas do endotélio. A disfunção endotelial é considerada secundária à exposição crônica da parede dos vasos sangüíneos devido à pressão arterial elevada, conseqüente de hipertensão (DEVEREUX & ROMAN, 1999). Além disso, a avaliação do tônus do endotélio-dependente em pacientes hipertensos envolve diversos fatores, como o óxido nítrico e o tromboxano A<sub>2</sub>.

Basicamente, o mecanismo que envolve a disfunção endotelial diferencia-se quanto ao grau hipertensivo, embora a vasodilatação dependente-endotélio esteja diminuída na maioria das formas de hipertensão. Portanto, esta não parece ser a provável causa da elevação da pressão sangüínea.

O tratamento da disfunção endotelial iniciou-se com uma intensa preocupação terapêutica. Além disso, os esforços para caracterização da hipertensão refratária (resistente) constituíram uma importante etapa na pesquisa clínica. Ainda não temos um modelo animal apropriado para o estudo dessas disfunções. Com isso, a hipertensão refratária continua sendo responsável pelo alto custo social.

Limitações do protocolo usado não permitiu concluir sobre a ausência da disfunção endotelial em hipertensos resistentes, quando dosados em marcadores bioquímicos endoteliais. Porém, essas alterações ainda não têm sido correlacionadas à concentração tecidual (GARIEPY *et al.*, 1993).

Percebe-se, então, a necessidade de novas pesquisas clínicas em outros fatores vasoativos, como a endotelina, o EDFH (fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e a angiotensina II.



## ***6. CONCLUSÕES***



Concluiu-se que não houve correlação entre os marcadores bioquímicos de função endotelial analisados e o remodelamento vascular / miocárdio em pacientes com HR.

Verificou-se, ainda, aumento na pressão de pulso nos pacientes com HR quando comparados com os demais grupos em estudo, provavelmente, consequência de fatores biomecânicos.

Além disso, os pacientes HR tiveram massa do ventrículo esquerdo aumentada. Com o objetivo de avaliar alteração em nível dos vasos (remodelamento vascular), utilizou-se o método de ultrassonografia de carótidas, através do qual pôde-se observar seu aumento em paciente HR.

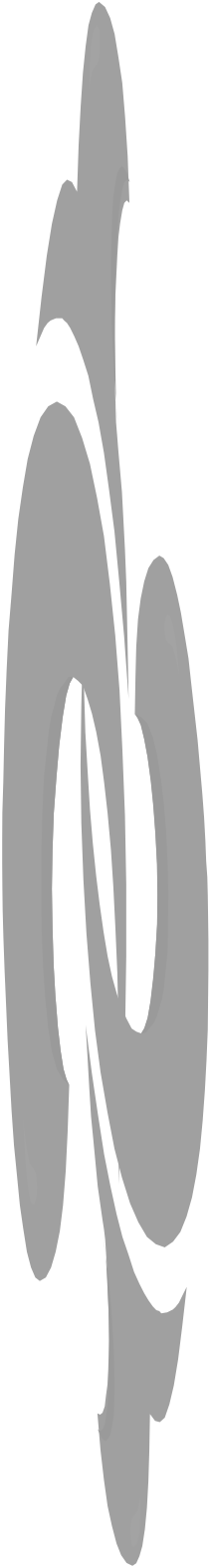
Através do ecocardiograma verificou-se HVE (alteração a nível do miocárdio) em pacientes HR. A ecocardiografia tem sido usada para avaliação indireta da disfunção endotelial em pacientes hipertensos.

Os resultados inalterados em níveis plasmáticos de nitritos e nitratos, GMPc e tromboxano B<sub>2</sub>, levam à conclusão de que talvez a potencialização das drogas anti hipertensivas utilizadas pelos voluntários estudados, possa ter interferido nos resultados obtidos.

Outra hipótese seria as alterações endoteliais estarem ocorrendo em nível tecidual e não a nível plasmático, como foi quantificado. Porém, limitações do protocolo não permitiu concluir sobre a ausência da disfunção endotelial em pacientes com HR.

Além disso, o endotélio é um órgão complexo que envolve diversas maneiras de ação na regulação do tônus vascular.

Finamente, concluiu-se que serão necessárias novas pesquisas clínicas em outros marcadores vasoativos, tal como a endotelina, fator hiperpolarizante derivado do endotélio e a angiotensina II.



## ***7. SUMMARY***

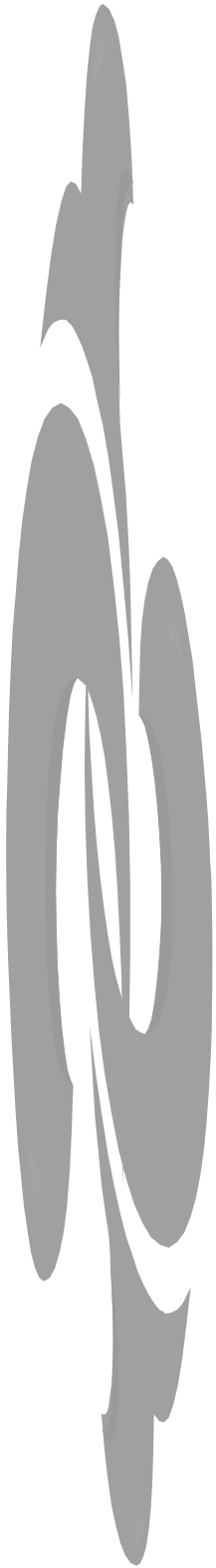
Hypertension is the most important and well established risk factor for atherosclerosis. The vascular and cardiac remodeling present in refractory hypertensive patients are related to endothelial dysfunction, a key factor in early atherogenesis and cardiovascular disease.

The relationship between endothelial function, cardiovascular remodeling and refractory hypertension is unknown.

We evaluated the left ventricular mass and function, carotid thickness, and plasma nitrate/nitrite, cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate (cGMP), and thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) levels in refractory hypertensive (RH; n=15) and healthy (CONTROL; n=15) subjects 22-65 years old. Carotid thickness, left ventricular mass index (LVMI) and left ventricular fraction ejection (LVFE) were estimated by duplex scan ultrasound. Nitrates/nitrites (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) were assayed using the Griess reaction, and plasma cGMP and thromboxane B<sub>2</sub> were determined by enzymatic immunoassay (ELISA).

Results: LVMI was higher in the RH group (138±20 vs 108±17 g/m<sup>2</sup>, p<0.001) but there was no significant difference in the ejection fraction (67±5% vs 69±4%). Pulse pressure (61±9 mmHg vs 46±10 mmHg) and carotid thickness (1.59±0.22 mm vs 1.04±0.14 mm) were significantly higher (p<0.001) in RH patients whereas NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, cGMP and thromboxane B<sub>2</sub> plasma concentrations were similar in both groups.

There was no correlation between cardiovascular remodeling and the various biochemical markers of endothelial function in refractory hypertensive patients.



## ***8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- ANASTASIOU, E.; MEGAS J.; ATHANASIOS S. - Impaired endothelium-dependent vasodilatation in women with previous gestational diabetes. **Diabetes Care**, **21**: 2111-5, 1998.
- ANVERSA, P.; RICCI, R.; OLIVETTI, G. - Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. **J Am Coll Cardiol**, **7**:1.140-9, 1986.
- AUCH-SCHWELK, W.; KATUSIC, Z.S.; VANHOUTTE, P.M. - Thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. **Hypertension**, **15**: 699-03, 1990.
- BAGUET, J.P.; MALLION, J.M.; MOREAU GAUDRY, A.; NOIRCLERC, M.; PÉOCH, M.; SICHE, J.P. - Relationships between cardiovascular remodeling and the pulse pressure in never treated hypertension. **J Hum Hypertens**, **14**:23-0, 2000.
- BAUMANN, R.; BLASS, C.; GOTZ, R.; DRAGON, S. - Ontogeny of Catecholamine and Adenosine Receptor-Mediated cAMP Signalling of Embryonic Red Blood Cells: Role of cGMP-Inhibited Phosphodiesterase 3 and Hemoglobin. **Blood**, **94(12)**: 4.314-0, 1999.
- BENOWITZ, N.L.; FITZGERALD, G.A.; WILSON, M.; ZHANG, Q. - Nicotine effects on eicosanoid formation and hemostatic function: comparison of transdermal nicotine and cigarette smoking. **J Am Coll Cardiol**, **22**:1159-67, 1993.
- BOULANGER, C.M. - Endothelial dysfunction: a novel therapeutic target. secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, **31**: 39-49, 1999.
- CABLE, D.G.; VINCENT, J.P.; TIMOTHY, O.; HARTZELL, V.S. - Recombinant gene transfer of endothelial nitric oxide synthase augments coronary artery relaxations during hypoxia. **Circulation**, **9-100(19 Suppl)** :1.335-9, 1999.

- CALVER, A.; COLLIER, J.; VALLANCE, P. - Forearm blood flow responses to a nitric oxide synthase inhibitor in patients with treated essential hypertension. **Cardiovasc Res**, **28**:1720-5, 1994.
- CASALE, P.N.; DEVEREUX, R.B; MILNER, N. - Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men. **Ann Inter Med**, **105**:173-8, 1986.
- CHEN, C.H.; TING, C.T.; LIN S.J.; HSU,T.L.; HO, S.J.; CHOU, P.; CHANG, M.S.; O'CONNOR, F; SPURGEON, H. - Which arterial and cardiac parameters best predict left ventricular mass?. **Circulation**, **98**: 422-8, 1998.
- CLARK, B.R. & ENGVALL, E. - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): theoretical and practical aspects. In: MAGGIO, E.T., ed. - **Enzyme-immunoassay**, CRC Press, 1980. 196p.
- COLLARD, C.D.; AGAH, A.; REENSTRA, W.; BURAS, J.; STAHL, G.L. - Endothelial nuclear factor-kappaB translocation and vascular cell adhesion molecule-1 induction by complement : inhibition with anti-human C5 therapy or cGMP analogues. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, **19(11)**: 2623-9, 1999.
- COLLIARD, M.; MICHELET, A.; TCHERDAKOFF, P. - Treatment of certain refractory arterial hypertension with a monoamine oxidase inhibitor. **Arch Mal Coeur Vaiss**, **74 Spec No**:99-106, 1981.
- COTORRUELO, J.G.; LLAMAZARES, C.; FLOREZ, J. - Minoxidil in severe and moderately severe hypertension, in association with methyldopa and chlortalidone. **Angiology**, **33(11)**:710-9, 1982.
- CUGINI, P. - Compliance and the chronotherapy of refractory arterial hypertension. **Recenti Prog Med**, **88 (10)**: 463-9, 1997.
- CUGINI, P. - The treatability of refractory or resistant hypertension by personalized antihypertensive chronotherapy based on ambulatory monitoring of the arterial pressure. **Recenti Prog Med**, **87(2)**: 51-7, 1996.

- CUSPIDI, C.; BOSELLI, L.; BRAGATO, R.; LONATI, L.; SAMPIERI, L.; BOCCIOLONE, M.; LEONETTI, G.; ZANCHETTI, A. - Echocardiographic and ultrasonographic evaluation of cardiac and vascular hypertrophy in patients with essential hypertension. **Cardiology**, **80**: 305-11, 1992.
- CUSPIDI, C.; LONATI, L.; SAMPIERI, L.; PELIZZOLI, S.; PONTIGGIA, G.; LEONETTI, G.; ZANCHETTI, A. - Left ventricular concentric remodeling and carotid structural changes in essential hypertension. **J Hypertens**, **14**: 1441-6, 1996.
- DATTILO, J.B.; MAKHOUL, R.G. - The role of nitric oxide in vascular biology pathobiology. **Ann Vasc Surg**, **11**: 307-14, 1997.
- DE CATERINA, R.; BASTA, G.; LAZZERINI, G.; DELLOMO, G.; PETRUCCI, R.; MORALE, M.; CARMASSI, F.; PEDRINELLI, R. - Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. **Arterioscler Throb Vasc Biol**, **17(11)**:2646-54, 1997.
- DEVEREUX, R.B. & ROMAN, M.J. - Left ventricular hypertrophy in hypertension: stimuli, patterns and consequences. **Hypertens Res**, **22**:1-9, 1999.
- DOTEVALL, A.; RÂNGEMARK, C.; ERIKSSON, E.; KUTTI, J.; WDAENVIK, H.; WENNMALN, A. - Cigarette smoking increases thromboxane A<sub>2</sub> formation without affecting platelet survival in young healthy females. **Thromb Haemost**, **68(5)**:588-93, 1992.
- FROHLICH, E.D. - The heart in hypertension - a 1991 overview. **Hypertension**, **18(III)**:62-8, 1991.
- FURCHGOTT, R.F.; CARVALHO, M.H.C.; KHAN, M.T. - Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. **Blood Vessels**, **24**:145-49, 1987.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADSKI, J.V. - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**:373-76, 1980.

- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADSKI, J.V. - Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ Res**, **53**:557-73, 1983.
- GAASCH, W.H.; LEVINE, H.J.; QUINONES, M.A.; ALEXANDER, J.K. - Left ventricular compliance: mechanisms and clinical implications. **Am J Cardiol**, **38**:645-53, 1976.
- GANDIA, M.C.; REDON, J.; LOZANO, J.V.; MORALES-OLIVAS, F.; RUBIO, E. - An evaluation of the control of antihypertensive treatment by using ambulatory arterial pressure monitoring. **Med Clin (Barc)**, **103(9)**:331-4, 1994.
- GARIEPY, J.; MASSONNEAU, M.; LEVENSON, J.; HEUDES, D.; SIMON, A. - Evidence for in vivo carotid and femoral wall thickening in human hypertension. **Hypertension**, **22**:111-8, 1993.
- GE, T.; HUGHES, H.; JUNQUERO, D.C. - Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-I and hypersensitivity to prostaglandin H<sub>2</sub> in the SHR aorta. **Circ Res**, **76**:1003-10, 1995.
- GIMBRONE, M.; NAGEL, T.; TOPPER, J.N. - Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. **J Clin Invest**, **99**:1809-13, 1997.
- GIMBRONE, M.A. - Vascular endothelium in health and disease. In: HABER, E., ed. - **Molecular Cardiovascular Medicine**, p.49-61, New York, 1995.
- GOLIKORSKY, M.S.; TSUKAHARA, H.; MAGAZINE, H.; ANDERSEN, T.T.; MALIK, A.V.; BAHOU, W.F. - Determination of endothelin signalling: role of nitric oxide. **J Cell Physiol**, **158**:485-94, 1994.
- GROSSMAN, W.; JONES, D.; MCLAURIN, L.P. - Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. **J Clin Invest**, **56**:56-64, 1975.
- GROSSMAN, W. - Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process?. **Am J Med**, **69**:576-84, 1980.



- GURGENIAN, S.V.; MIKAELIAN, E.S.; DZHANDZHAPANIAN, A.Z.; BABAIAN, A.S. - Efficacy of intravenous verapamil in arterial hypertension refractory to three-step antihypertensive therapy. **Cor Vasa**, **33(5)**:397-403, 1991.
- HAMAD, A.M. & KNOX, A.J. - Mechanisms Involved in Desensitization of Particulate Guanylyl Cyclase in Human Airway Smooth Muscle: The Role of Protein Kinase C. **Biochem Biophys Res Commun**, **266(1)**: 152-5, 1999.
- HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; SAMUELSSON, B. - Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proc Natl Acad Sci**, **72**:2994-8, 1975.
- HAYNES, W.G. & WEBB, D.J. - Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. **Lancet**, **344**:852-4, 1994.
- HAYNES, W.G.; NOON, J.P.; WALKER, B.R.; WEBB, D.J. - Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. **J Hypertens**, **11**:1375-80, 1993.
- HERLITZ, H. et al. - Clinical evaluation of felodipine in patients with refractory hypertension. **Drugs**, **34**(suppl. 3):151-5, 1987.
- HIGASHI, Y.; OSHIMA, T.; SASAKI, N.; ISHIOKA, N.; NAKANO, Y.; OZONO, R.; YOSHIMURA, M.; ISHIBASHI, K.; MATSUURA, H.; KAJIYAMA, G. - Relationship between insulin resistance and endothelin-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **Hypertension**, **29**:280-5, 1998.
- HUGHES, A.D.; SINCLAIR, A.M.; GEROUKAKOS, G.; MAYET, J.; MACKAY, J.; SHAHI, M.; THOM, S.; NICOLAIDES, A.; SEVER, P.S. - Structural changes in the heart and carotid arteries associated with hypertension in humans. **J Hum Hypertens**, **7**:395-7, 1993.
- HUSSAIN, M.B.; HOBBS, A.J.; MAC ALLISTER, R.J. - Autoregulation of nitric oxide-soluble guanylate cyclase-cyclic GMP signalling in mouse thoracic-aorta. **Br J Pharmacol**, **128(5)**:1082-8, 1999.

- IMHOLZ, B.P.; LANGE WOUTERS, G.J.; VAN MONTFRANS, G.A. - Pressor effect of a soccer match (1988 European championship), registered via the Portapres. **Ned Tijdschr Geneeskd**, **133**: 1127-31, 1989.
- IMHOLZ, B.P.M.; LANGE WOUTERS, G.J.; VAN MONTFRANS, G.A.; PARATI, G.; VAN GOUDOEVER, J.; WESSELING, K.H.; WIELING, W.; MANCIA, G. - Feasibility of ambulatory, continuous 24-hour finger arterial pressure recording. **Hypertension**, **21**:65-73, 1993.
- JIA, L. & FURCHGOTT, R.F. - Inhibition by sulfhydryl compounds of vascular relaxation induced by nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. **J Pharmacol Exp Ther**, **267**:371-78, 1993
- JOINT NATIONAL COMMITTEE. **V Report Arch Intern Med**, p.153-4, 1993.
- JORGE, P.A.R. - Endotélio, Lípidos e Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, **2**:68, 1997.
- KANNEL, W.B. - Historic perspectives on the relative contributions of diastolic and systolic blood pressure elevation to cardiovascular risk profile. **Am Heart J**, **138**:205:10, 1999.
- KANNEL, W.B. - Hypertension as a risk factor cardiac events-epidemiologic results of long-term studies. **J Cardiovasc Pharmacol**, **21**(Suppl 2):S27-S37, 1993.
- KHATTAR, R.S.; ACHARYA, D.V.; KINSEY, C.; SENIOR, R.; LAHIRI, A. - Longitudinal association of ambulatory pulse pressure with left ventricular mass and vascular hypertrophy in essential hypertension. **J Hypertens.**, **15**:737-43, 1997.
- KLEINER, J.P. et al. - The outpatient treatment of refractory hypertension with minoxidil. **South Med**, **70**(7): 814-7, 1987.
- KOSONEN, O.; KANKAANRANTA, H.; MALO-RANTA, U.; MOILANEN, E. - Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophil adhesion to endothelial. **Eur J Pharmacol**, **8-382** (2):111-7, 1999.

- LAURINDO, F.R.M; PASSAGLIA, R.C.A.; DA LUZ, P.L.; AUGUSTO, O. - Hipertensão Arterial e Endotélio. in: Sociedade Brasileira de Cardiologia - Departamento de Hipertensão Arterial, ed. **Hipertensão Arterial**, **1**:153-66, 1997.
- LEE, J.; KIM, S.W.; KOOK, H.; KANG, D.G.; KIM, N.H.; CHOI, K.C. - Effects of L-arginine on cyclosporin-induced alterations of vascular NO/ cGMP generation. **Nephrol Dial Transplant**, **14 (11)**:2634-8, 1999.
- LEVIN, E.R. - Mechanisms of disease: endothelins. **N Engl J Med**, **333**:356-63, 1995.
- LI, H.; FÖRSTERMANN, U. - Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. **J Pathol**, **190**:244-54, 2000.
- LINDER, L.; KIOWSKI, W.; BÜHLER, F.R.; LUSCHER, T.F. - Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. **Circulation**, **81**:1762-7, 1990.
- LÜSCHER, T.F. & VANHOUTTE, P.M. - **The endothelium: Modulator of cardiovascular function**. Boca Raton, CRC Press, 1990, 254p.
- MANCIA, G.& PARATI, G. - Experience of 24-hour ambulatory blood pressure in hypertension. **Am Heart J**, **116**:1134-40, 1988.
- MANNICK, J.B.; STAMLER, J.S.; TENG, E.; SIMPSON, N.; LAWRENCE, J.; JORDAN, J.; FINBERG, R.W. - Nitric oxide modulates HIV-1 replication. **J Acquir Immune Defic Syndr**, **1-22(1)**:1-9, 1999.
- MCVEIGH, G.E.; BRENNAN, G.M.; JOHNSON, G.D. - Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, **35**:771-6, 1992.
- MCVEIGH, G.E.; LEMAY, L.; MORGAN, D.; COHN, J.N. - Effects of long-term cigarette smoking on endothelium-dependent responses in humans. **Am J Cardiol**, **78**:668-72, 1996.

- MEHTA, J.L. & ROBERTS, A. - Human vascular tissues produce thromboxane as well as prostacyclin. **Am J Physiol**, **244**:R839-44, 1983.
- MEJIA, A.D.; EGAN, B.M.; SCHORK, N.J.; ZWEIFLER, A.J. - Artefacts in measurement of blood pressure and lack of target organ involvement in the assessment of patients with treatment-resistant hypertension. **Ann Intern Med**, **112(4)**:270-77, 1990.
- MITCHELL, G.F.; PFEFFER, J.M.; PFEFFER, M.A. - The heart and conduit vessels in hypertension. **Medical Clinics of North America**, **6**:1247-71, 1997.
- MORENO JÚNIOR, H.; CHALON, S.; URAE, A.; TANGPHAO, O.; ABIOSE, A.K.; HOFFMAN, B.B.; BLASCHKE, T.F. - Endothelial dysfunction in human hand veins is rapidly reversible after smoking cessation. **Am J Physiol**, **275**:H1040-5, 1998.
- MUIESAN, M.A.; PASINI, G.; SALVETTI, M.; CALEBICH, S.; ZULLI, R.; CASTELLANO, M.; RIZZONI, D.; BETTONI, G.; CINELLI, A.; PORTERI, E.; CORSETTI, V.; ROSEI-AGABITI, E. - Cardiac and vascular structural changes: Prevalence and relation to ambulatory blood pressure in a middle-aged general population in Northern Italy: The Vobarno Study. **Hypertension**, **27**:1046-52, 1996.
- MUSCARÁ, M.N. & DE NUCCI, G. - Simultaneous determination of nitrite and nitrate anions in plasma, urine and cell culture supernatants by high-performance liquid chromatography with post-column reactions. **Journal of Chromatography B**, **686**:157-64, 1996.
- NAKAMURA, M. - Peripheral vascular remodeling in chronic heart failure: clinic relevance and new conceptualization of its mechanisms. **J Card Fail**, **5(2)**:127-38, 1999.
- OMBONI S. & SMIT A.A.J. - Wieling W. Twenty four hour continuous non-invasive finger blood pressure monitoring: a novel approach to the evaluation of treatment in patients with autonomic failure. **Br Heart J**, **3**:290-92, 1995.
- PANZA J.A.; CASINO, P.R.; BADAR, D.M.; QUYYUMI, A.A. - Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. **Circulation**, **87**:1475-81, 1993.

- PANZA, J.A.; QUYYUMI, A.A.; BRUSH, J.E. - Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **N Engl J Med**, **323**:22-7, 1990.
- PARATI, G.; MUTTI, E.; RAVOGLI, A.; TRAZZI, S.; VILLANI, A.; MANCIA, G. - Advantages and disadvantages of non-invasive ambulatory blood pressure monitoring. **J Hypertens**, **8**:535-8, 1990.
- PONTREMOLI, R.; ROBAUDO, C.; GAITER, A. - Long-term minoxidil treatment in refractory hypertension and renal failure. **Clin Nephrol**, **1**:35-9, 1991.
- ROMAN, M.J.; PICKERING, T.G.; SCHWARTZ, J.E.; PINI, R.; DEVEREUX, R.B. - Association of carotid atherosclerosis and left ventricular hypertrophy. **J Am Coll Cardiol**, **25**:83-90, 1995.
- ROMAN, M.J.; PICKERING, T.G.; SCHWARTZ, J.E.; PINI, R.; DEVEREUX, R.B. - Relation of arterial structure and function to left ventricular geometric patterns in hypertensive adults. **J Am Coll Cardiol**, **28**:751-6, 1996.
- RUBATTU, S.; LEE-KIRSCH, M.A.; DE PAOLI, P.; GILIBERTI, R.; GIGANTE, B.; LOMBARDI, B.; VOLPE, M. - Altered structure, regulation, and function of the gene encoding the atrial natriuretic peptide in the stroke-prone spontaneously hypertensive Rat. **Circ Res**, **85 (10)**:900-5, 1999.
- SIMONIESCU, N. - Functions of endothelial cell surface. **Annu Rev Physiol**, **48**: 279-93, 1986.
- SINOWAY, L.I.; HENDRICKSON, C.; DAVIDSON, W.R.JR.; PROPHET, S.; ZELIS, R. - Characteristics of flow-mediated brachial artery vasodilation in human subjects. **Circ Res**, **64**:32-42, 1989.
- STAMLER, J.S.; LOH, E.; RODDY, M.A.; CURRIE, K.E.; CREAGER, M.A. - Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. **Circulation**, **89**:2035-40, 1994.

- STERGIOPULOS, N. & WESTERHOF, N. - Determinants of pulse pressure. **Hypertension**, **32**:556-9, 1988.
- STRAUER, B.E. - Myocardial oxygen consumption in chronic heart disease: Role of wall stress, hypertrophy and coronary reserve. **Am J Cardiol**, **44**:730-40, 1979.
- STRAUER, B.E. - Ventricular function and coronary hemodynamics in hypertensive heart disease. **Am J Cardiol**, **44**:999-1006, 1979.
- SUNG, B.H.; WILSON, M.F.; IZZO Jr, J.L.; RAMIREZ, L.; DANDONA, P. - Moderately obese, insulin resistant women exhibit abnormal vascular reactivity to stress. **Hypertension**, **30**:848-53, 1997.
- SURKS, H.K.; MOCHIZUKI, N.; KASAI, Y. - Regulation of Myosin Phosphatase by a specific interaction with cGMP-Dependent Protein Kinase Ialpha. **Science**, **286(5444)**:1583-7, 1999.
- TADDEI, S.; VIRDIS, A.; MATTEI, P.; GHIADONI, L.; FASOLO, C.B.; SUDANO, L.; SALVETTI, A. - Hypertension causes premature ageing of endothelial function in humans. **Hypertension**, **29**:736-43, 1997.
- The sixth reporter of the joint national committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure (JNC VI). **NIH Publication**, **98-4080**:1-70, 1997.
- TICE, F.D.; PETERSON, J.W.; ORSINELLI, D.A.; BINKLEY, P.F.; CODY, R.J.; GUTHRIE, R.; PEARSON, A.C. - Vascular hypertrophy is an early finding in hypertension and is related to arterial pressure waveform contour. **Am Heart J**, **132**:621-7, 1996.
- TOLEDO, J.C.Y. - Estudo comparativo da reatividade vascular em tabagistas, diabéticos e hipertensos. Campinas, 2000. [Tese - Mestrado - FCM UNICAMP]
- TRAUB, O. & BERCK, B.C. - Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. **Arterioscler Tromb Vasc Biol**, **18**:677-85, 1998.

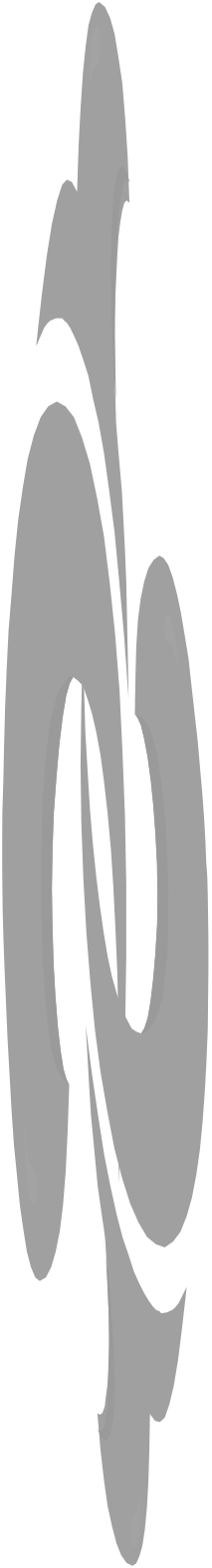
- VAN DER BORNE, P.; NGUYEN, H.; LINKOWSKI, P.; DEGAUTE, J.P. - Sleep quality and continuous, non-invasive beat-to-beat blood pressure recording. **Journal of Hypertension**, **11**:1423-7, 1993.
- VANE, J.R.; ÄNGGARD, E.E.; BOTTING, R.M. - Mechanisms of disease: regulatory functions of the vascular endothelium. **N Eng J Med**, **323**:27-36, 1990.
- VANHOUTTE, P.M.; PERRAULT, L.P.; VILAINE, J.P. - Endothelial dysfunction and vascular disease. In: RUBANYI, G.M. & DZAU, V.J., eds. - **The endothelium in clinical practice: source and target of novel therapies**. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 1997. p. 265-89.
- VITA, J.A.; TREASURE, C.B.; NABEL, E.G.; MCLENACHAN, J.M.; FISH, R.D.; YEUNG, A.C.; VEKSTEIN, V.I.; SELWYN, A.P.; GANZ, P. - Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. **Circulation**, **81**:491-7, 1990.
- WEISS, H.R.; GONG, G.X.; STRAZNICKA, M.; YAN, L.; TSE, J.; SCHOLZ, P.M. - Cyclic GMP and cyclic AMP induced changes in control and hypertrophic cardiac myocyte function interact through cyclic GMP affected cyclic-AMP. **Can J Physiol Pharmacol**, **77(6)**:422-31, 1999.
- WENDELHAG, I.; GUSTAVSSON, T.; SUURKULA, M.; BERGLUND, G.; WIKSTRAND, J. - Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analyzing system. **Clin Physiol**, **11**:565-77, 1991.
- WESSELING, K.H.; JANSEN, J.R.C.; SETTELS, J.J.; SCHREUDER, J.J. - Computation of aortic flow from pressure in humans using a nonlinear, three-element model. **J Appl Physiol**, **74**:2.566-73, 1993.
- WHITE, N.J.; RAJAGOPALAN, B.; YAHAYA, H.; LEDINGHAM, J.G. - Captopril and frusemid in severe drug-resistant hypertension. **Lancet**, **2(8186)**:108-10, 1980.

YAKOVLEVITCH, M. & BLACK, H.R. - Resistant hypertension in a tertiary care clinic.  
**Arch Intern Med**, **151**:1.786, 1991.

ZATZ, R. & BAYLIS, C. - Chronic nitric oxide inhibition model six years on.  
**Hypertension**, **32**:958-64, 1998.

ZWISSLER, B.; KEMMING, G.; MERKEL, M.; WOLFRAM, G.; KLEEN, M.; HABLER  
O.; HALLER, M.; BRIEGEL, J. - Response to Inhaled Nitric Oxide (NO) is not  
Associated with Changes of Plasma cGMP Levels in Patients with Acute Lung  
Injury. **Eur J Med Res**, **22:4(11)**:463-7, 1999.





## ***9. ANEXOS***

Envolvimento do Endotélio na resposta vascular em portadores de hipertensão arterial resistente

Data:

Carta dos direitos do voluntário em pesquisa médica

Os indivíduos que participam em pesquisa médica adquirem certos direitos.

Estes direitos incluem:

a) Informações e explicações a respeito:

- dos procedimentos, aparelhos e drogas a serem utilizados;
- da natureza e proposta da pesquisa;
- de possíveis desconfortos e riscos que eventualmente possam ocorrer ou estarem sujeitos;
- de possíveis benefícios advindos da pesquisa;
- outras alternativas de tratamento que possam lhe ser vantajosas;
- da evolução da pesquisa e dos resultados referentes a si próprio';

b) encaminhamento a tratamento médico caso complicações ocorram;

c) fazer questões a respeito dos experimentos ou procedimentos envolvidos;

d) ser instruído de que o consentimento para participar do estudo pode ser retirado a qualquer momento, inclusive sem justificativas, sem prejuízo do tratamento/seguimento do voluntário por parte da instituição de saúde;

e) receber uma cópia deste consentimento datada e assinada pelo pesquisador responsável ou seus auxiliares autorizados para tal;

f) consentir ou não em participar do estudo sem qualquer coerção ou outro tipo de influência por parte de elementos envolvidos na pesquisa.

---

Assinatura do voluntário

---

Data

---

Assinatura do investigador

### Consentimento Informado

Você está convidado a participar de um estudo para investigar porque certos portadores de hipertensão arterial (HA) não obtêm redução da pressão arterial, mesmo tomando corretamente as medicações prescritas pelo médico. São chamados pacientes com HA resistente.

Você pode se candidatar a participar do estudo se obtiver a autorização do médico que o (a) assiste, trazendo a receita médica e respectivos medicamentos que vem tomando.

Se você decidir participar do estudo, o Dr. Heitor Moreno Júnior ou outros médicos da equipe descreverão detalhadamente o estudo a você. Você permanecerá no Setor de Ecocardiografia do HC - UNICAMP, durante a manhã do estudo (por 6 horas) e não poderá fumar, tomar chá ou café, derivados de Coca-Cola durante todo este período.

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

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

Durante a permanência no hospital, você ficará deitado em um divã com um dos braços confortavelmente apoiado em um suporte de espuma. Imediatamente após tomar suas medicações habituais, um "butterfly" nº 21 (agulha de injeção) será colocado em uma veia da mão ou braço para coletas de sangue (12 amostras de 10 ml cada uma, durante as 6 horas). Um aparelho de pressão arterial será colocado em torno do seu dedo da mão direita e outro aparelho em torno do braço esquerdo para medidas de pressão arterial e de frequência cardíaca, além da monitorização eletrocardiográfica.

Após o período de 6 horas, você poderá alimentar-se (exceto café, chá e Coca-cola) e de ambular normalmente, retornando ao lar, mas apresentando-se novamente ao Ambulatório na manhã seguinte, para retirada do monitor de pressão arterial (braço) e realização da última coleta de sangue. Os riscos deste estudo são exclusivamente da punção venosa com agulha, já que a quantidade de sangue total retirada corresponde a cerca de 40% do coletado em uma doação de sangue, e as drogas administradas serão obrigatoriamente as mesmas prescritas pelo médico que o (a) acompanha. Pequenos hematomas podem ocorrer quando da punção venosa. Infecção local é muito infreqüente.

A urina será coletada durante 24 horas de estudo nas micções espontâneas. O volume total de sangue a ser coletado durante o período total de estudo ( 3 meses) não será superior a 200 ml.

É esperado que esse estudo e seus resultados contribuam para um melhor conhecimento sobre a participação da disfunção endotelial em pacientes com hipertensão resistente.

Os voluntários serão beneficiados diretamente com a realização desse estudo, pois terão condições de conhecer o comportamento dos níveis de pressão arterial frente à(s) medicação(ões) rotineiramente utilizadas, durante 24 horas, através de sistemas não invasivos.

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 identidade dos voluntários nela envolvidos.

---

Assinatura do voluntário

---

Data

---

Assinatura do investigador ou testemunha

Você receberá ao término do estudo a quantia de R\$ 20,00 ( vinte reais). Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Dr. Heitor Moreno Júnior (telefone: 3788-7185, ramal 228), do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Teremos satisfação em esclarecê-la. O telefone da Comissão de Ética em Pesquisa da FCM/ UNICAMP é: 3289-8656.

Todos os tipos de tratamento ou diagnóstico médico, experimental ou não, envolvem algum risco de prejuízo à saúde. O estudo será realizado em ambiente hospitalar (HC/UNICAMP). Portanto com os recursos disponíveis para atendimento de possíveis emergências.

**A SUA ASSINATURA EM CADA PÁGINA DESTE DOCUMENTO SIGNIFICA QUE:**

- **VOCÊ LEU E ENTENDEU AS INFORMAÇÕES ACIMA**
- **VOCÊ DISCUTIU O ESTUDO COM O INVESTIGADOR PRINCIPAL E/OU SUA EQUIPE;**
- **VOCÊ DECIDIU PARTICIPAR DO ESTUDO COM BASE NAS INFORMAÇÕES FORNECIDAS;**
- **UMA CÓPIA DESTE CONSENTIMENTO FOI DADA A VOCÊ.**

---

Assinatura do voluntário

---

Data

---

Assinatura do investigador ou testemunha.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
✉ Caixa Postal 6111  
13083-970 Campinas-S.P.  
☎ 0 \_ 19 7888936  
fax 0 \_ 19 7888925  
✉ [cep@head.fcm.unicamp.br](mailto:cep@head.fcm.unicamp.br)

CEP, 24/05/01  
(Projeto 161/98)


PARECER: Nº 125/98

PESQUISA: “ENVOLVIMENTO DO ENDOTÉLIO NA RESPOSTA VASCULAR A DROGAS ANTI-HIPERTENSIVAS EM PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL RESISTENTE”

PESQUISADOR: Heitor Moreno Júnior/Maira Helena C. Favarelli

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores, aprova a pesquisa supracitada bem como o Consentimento Pós-Infirmação por estarem contempladas as Resoluções 196/96 e 251/97.

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de outubro de 1998.

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

**Tabela A:** Características clínicas dos grupos Controle e HR

	<b>CONTROLE (Normotensos) (n=15)</b>	<b>HR (n=15)</b>
Idade (anos)	43.3±12.1	52.8±9.7
Peso corpóreo (kg)	76.5±18.4	88.7±20.5
Altura (cm)	168.2±7.2	169.7±6.4
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27±0.6	30±0.6
PAS (mmHg)	126.4±12.8	159.3±10.1
PAD (mmHg)	80.4±4.1	106.7±7.5
FC (bpm)	79.8±12.6	76.3±15.0
Glicemia (mg/dl)	89.6±11.2	103.7±14.2
Hb Glicosilada (total Hb%)	7.1±0.7	7.0±0.1
Colesterol total (mg/dl)	215.6±34.2	199.2±30.9
Triglicérides (mg/dl)	168.20±71.9	162.4±74.7

Os valores encontram-se expressos em média ± DP.



**Tabela B:** Determinação plasmática dos marcadores bioquímicos endoteliais: nitrato/nitrito, TXB<sub>2</sub> e GMPc nos dois grupos estudados

	<b>CONTROLE (Normotensos) (n=15)</b>	<b>HR (n=15)</b>
<b>Nitrato/nitrito (μM)</b>	98±18	82±12
<b>Tromboxano B<sub>2</sub> (pg/ml)</b>	422±70	456±129
<b>GMPc (pmol/ml)</b>	2.1±0.3	1.9±0.3

Os resultados encontram-se expressos em média ± DP.

**Tabela C:** Pressão de pulso (PP), índice de massa ventricular esquerda (IMVE), lefração de ejeção VE (FEVE) e diâmetro de carótidas em pacientes normotensos e hipertensos resistentes

	<b>CONTROLE</b>	
	<b>(Normotensos)</b>	<b>R H (n=15)</b>
	<b>(n=15)</b>	
<b>PP (mmHg)</b>	46.0±10.04	61.2±9.08*
<b>IMVE (g/m<sup>2</sup>)</b>	108.3±17.3	138.3±19.8*
<b>FEVE (%)</b>	69.2±4.0	67.3±5.0
<b>Diâmetro médio de carótidas (mm)</b>	1.04±0.14	1.59±0.22*

\*P< 0.001

Os resultados encontram-se expressos em média ± DP.

Word Counts: Abstract: 216

Text: 1630

Number of references: 41

Figures - 0

Tables - 3

## **Endothelial function and cardiovascular remodeling in refractory arterial hypertension**

**Máira Cittadino\***, BSc, **Márcio Gonçalves de Sousa\***, MD, **Juan Carlos Yugar-Toledo\***, MD, MSc, **João Carlos Rocha#**, MD, **José Eduardo Tanus-Santos\***, MD, PhD and **Heitor Moreno Jr\***, MD, PhD.

**\*Department of Pharmacology and #Department of Cardiology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6111, 13083-970 Campinas, SP, Brazil**

Short Title: **Endothelial function in refractory hypertension**

Corresponding author: **Heitor Moreno Júnior, MD, PhD**

**Department of Pharmacology**

Faculty of Medical Sciences

State University of Campinas (UNICAMP)

PO Box 6111

13083-970, Campinas, SP, Brazil

**FAX: +55 19 3289 2968**

E-mail: [hmoreno@uol.com.br](mailto:hmoreno@uol.com.br)

## **Abstract**

**Background:** Hypertension is the most important and well established risk factor for atherosclerosis. The vascular and cardiac remodeling present in refractory hypertensive patients are related to endothelial dysfunction, a key factor in early atherogenesis and cardiovascular disease. The relationship between endothelial function, cardiovascular remodeling and refractory hypertension is unknown. **Methods:** We evaluated the left ventricular mass and function, carotid thickness, and plasma nitrate/nitrite, cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate (cGMP), and thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) levels in refractory hypertensive (RH; n=15) and healthy (CONTROL; n=15) subjects 22-65 years old. Carotid thickness, left ventricular mass index (LVMI) and left ventricular fraction ejection (LVFE) were estimated by duplex scan ultrasound. Nitrates/nitrites (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) were assayed using the Griess reaction, and plasma cGMP and thromboxane B<sub>2</sub> were determined by enzymatic immunoassay (ELISA). Results: LVMI was higher in the RH group (138±20 vs 108±17 g/m<sup>2</sup>, p<0.001) but there was no significant difference in the ejection fraction (67±5% vs 69±4%). Pulse pressure (61±9 mmHg vs 46±10 mmHg) and carotid thickness (1.59±0.22 mm vs 1.04±0.14 mm) were significantly higher (p<0.001) in RH patients whereas NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, cGMP and thromboxane B<sub>2</sub> plasma concentrations were similar in both groups.

**Conclusion:** There was no correlation between cardiovascular remodeling and the various biochemical markers of endothelial function in refractory hypertensive patients.

**Key words:** Resistant hypertension, endothelium, cardiac hypertrophy, pulse pressure and biochemical markers.

## Introduction

Hypertension increases the risk of atherosclerosis and premature cardiovascular disease<sup>1,2</sup>. In addition, patients with uncontrolled hypertension have an increased risk of stroke, myocardial infarction, congestive heart failure and renal failure<sup>3</sup>. Refractory hypertension (RH) is a concern in primary care and represents a significant portion of referrals to tertiary clinics, with an estimated prevalence of up to 18%<sup>4-6</sup>. RH is resistant to at least three classes of antihypertensive drugs, including diuretics, with all of them at almost high doses<sup>7</sup>. Recent studies have included chronotherapeutic criteria<sup>8,9</sup>.

Cardiovascular remodeling in systemic hypertension is explained mostly by hemodynamic factors<sup>10,11</sup>. Systemic hypertension induces changes in the left ventricular geometry, which may eventually lead to left ventricular hypertrophy (LVH), an important risk factor for cardiovascular complications<sup>12-14</sup>. Ultrasound studies of conduit vessel structure have revealed dilation and intimal-medial thickening in the aorta, carotid, and femoral and radial arteries in patients with hypertension<sup>15-18</sup>. Ultrasonography is a reliable and reproducible technique which allows measurement of the intima-media thickness (IMT) and of the luminal diameter of carotid arteries<sup>19,20</sup>. Several studies have shown that the relationship between cardiac remodeling and carotid lesions in systemic hypertension is independent of the blood pressure<sup>21-23</sup>. Of the BP parameters related to cardiac and arterial remodeling, pulse pressure (PP) appears to have an important role<sup>24-26</sup>.

In this study, we compared the degree of cardiac and vascular remodeling in healthy subjects and patients with refractory hypertension. We also assayed the plasma levels of nitrates/nitrites as a measure of nitric oxide synthase activity and quantified plasma cyclic 3',5'-guanosine monophosphate (cGMP, a second messenger of NO) and thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>, the stable breakdown product of TXA<sub>2</sub>).

## **Methods**

### **Study participants**

The volunteers for this study were:

Control group- 15 healthy subjects with no familial history of coronary artery disease and arterial hypertension (blood pressure < 140/90 mmHg), who were also non-hypercholesterolemic, non-diabetic and non-smokers.

Refractory hypertensive group- 15 subjects with uncontrolled essential hypertension who were recruited from diagnosed cases at our outpatient clinic. Patients with secondary forms of hypertension, cardiac and/or cerebral ischemic vascular disease, impaired renal function, or other major pathologies were excluded from the study. In accordance with current legislation, all patients were aware of the investigational nature of the study and gave their written informed consent before participating. This study was approved by the Institutional Committee for Ethics in Research.

### **Experimental procedure**

All studies were initiated at 8a.m., after an overnight fast, with the subjects lying supine in a quiet, air-conditioned room (22°-24°C).

### **Study protocol**

Blood samples were collected into tubes containing EDTA for the measurement of resting nitrate/nitrite, cGMP, and thromboxane B<sub>2</sub> levels. Determination of the stable end products (nitrate/nitrite) of NO radical degradation is frequently used as a marker for nitric oxide synthase activity. The assay used was based on the determination of nitrite in the Griess reaction. Nitrate was measured as nitrite after enzymatic conversion by nitrate reductase as described by Green et al <sup>(30)</sup>. Plasma cGMP and thromboxane B<sub>2</sub> levels were quantified using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). The plasma was separated by centrifugation and stored at -20°C until assayed. Prior to being assayed, the plasma samples were extracted

with ethanol and the supernatants were evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The dried samples were reconstituted with ELISA buffer and assayed according to the manufacturer's instructions.

Left ventricular (LV) dimensions of all subjects were obtained by the same sonographer using an ATL HDI System (Advanced Technology Laboratories, Seattle, WA, USA) with a 2.5 MHz transducer, in accordance with the standard recommendations of the American Society of Echocardiography. LV wall thickness was calculated as the average of interventricular septal and posterior wall thicknesses. Left ventricular mass (LVM) was calculated from the 2-D guided M-mode echocardiogram. LV end-systolic and end-diastolic volumes were calculated by the Teichholz method.

We also measured on-line diameter from frozen, digitized images of the right and left common carotid arteries and recorded the carotid intimal-medial thickness (IMT) of the anterior and posterior walls using a 7 MHz linear array transducer and high definition imaging with an ATL HDI System.

All images were recorded on videotape and analyzed by two observers who did not know the identity of the subjects.

### **Statistical analysis**

Descriptive data were expressed as the mean values  $\pm$  SD. The sample size was calculated for a power of 0.80. Statistical comparisons were done using analysis of variance, and the least significant difference test was used to determine significant differences between the groups. Multiple comparison tests were used when appropriate. A  $p$  value  $< 0.05$  was considered to indicate significance.

## Results

The clinical characteristics of the two groups are shown in Table 1. There was no difference between two groups.

### *Biochemical parameters*

There were no differences between the plasma nitrate/nitrite, cGMP and TXB2 levels of the two groups studied (Table 2).

## Discussion

Pulse pressure and carotid thickness measurements were higher in refractory hypertensive (RH) patients whereas NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, cGMP and thromboxane B<sub>2</sub> plasma concentrations were similar in both groups.

The cardiac and vascular remodeling to hypertension is a complex dynamic process, with mechanical, molecular, genetic, and biochemical factors involved<sup>27</sup>. Left ventricular mass (LVM) is determined by integrated signaling of multiple stimuli, including the mechanical loads imposed on the heart. Elevated blood pressure, the easiest index of arterial load to measure, is a well-recognized cause of increased LVM<sup>28</sup>, and serves as an adaptive mechanism to normalize wall stress<sup>29,30</sup>. Systolic and diastolic pressure, and hence pulse pressure, are determined by the complex interaction of the heart and the arterial and venous systems<sup>31</sup>. Total arterial compliance and peripheral resistance are apparently the only two important arterial parameters which determine aortic pulse pressure<sup>32,33</sup>, one of the strongest predictors of coronary heart disease and cardiovascular mortality<sup>34,35</sup>.

In hypertension, the blood pressure curve results from the summation of a steady component ( mean arterial pressure, MAP) and a pulsatile component (PP)<sup>36</sup>. The relative contributions of these two components is influenced by age, particularly by the level of arterial stiffness, one of the major determinants of PP<sup>36</sup>. In young individuals with RH, isobaric carotid and aortic rigidities are similar to those of normotensive controls<sup>37</sup>, in association with proportional increases in MAP and PP<sup>36</sup>. In older individuals, isobaric carotid and aortic rigidities are reduced, indicating pressure-independent alterations of the



stiffness of wall material<sup>38</sup>, with a disproportional increase of PP over MAP, but no increase in stroke volume. This hemodynamic pattern is usually considered a direct consequence of structural changes within the aortic wall<sup>36,38</sup>. However, acute administration of the NO-donor sodium nitroprusside reverses the increase in PP<sup>39</sup>, independent of structural vascular changes. Thus, endothelial dysfunction plays a major role in vasomotor and NO-dependent alterations, and is responsible for the increased aortic stiffness and PP<sup>40</sup>.

Abnormalities in endothelial function are considered to be secondary to the chronic exposure of blood vessel walls to the elevated arterial pressure resulting from hypertension. The evaluation of endothelium-dependent tone in hypertensive patients has involved several mediators, including NO and TXA<sub>2</sub>. The mechanisms underlying this endothelial dysfunction vary from one form of hypertension to another. Although endothelium-dependent vasodilation is impaired in most forms of hypertension, this is not likely to be the cause of elevated blood pressure.

The treatment of endothelial dysfunction a novel therapeutic target in clinical conditions such as hypertension. The relatively low prevalence of endothelial dysfunction<sup>41</sup> and the fact that there is currently no adequate animal model of such dysfunctions, means that refractory hypertension has a high cost benefit ratio. Echocardiography and BP monitoring systems have been used for non-invasive morphological and functional assessments of endothelial dysfunction in hypertensive patients. Biochemical markers have also been used to evaluate hypertensive states. In this study, we tested the hypothesis that NO and/or TXA<sub>2</sub> could be involved in the pathophysiology of RH. The plasma levels of these mediators were unaltered in RH. On the other hand, PP was higher in resistant hypertensives than in normotensive controls. The limited number of parameters assessed here does not us to be categorical about the absence of endothelial dysfunction in RH, since plasma biochemical markers have been found not to correlate with their tissue concentrations. As the endothelium is a complex organ involving several pathways acting on the regulation of vascular tone, other vasoactive factors such as endothelin, endothelial-derived hyperpolarizing factor (EDFH) and angiotensin II would need to be assessed in these patients.

## **Conclusion**

In conclusion, these results show that there was no correlation between the biochemical markers assessed and myocardial/vascular remodeling in refractory hypertensive patients.

## **Acknowledgments**

This study and J.E.T.S. were supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, SP, Brazil). H. Moreno Jr. was supported by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Brazil).

## **References**

- Andersson O: Management of hypertension: clinical and hemodynamic studies with special reference to patients refractory to treatment. *Acta Med Scan Suppl* 1977;617:S1-S62.
- Baguet J-P, Mallion J-M, Moreau-Gaudry A, Noirclerc M, Péoc`h M and Siché J-P. Relationships between cardiovascular remodeling and the pulse pressure in never treated hypertension. *J Hum Hypertens* 2000;14: 23 – 30.
- Benetos A, Safar M, Rudnichi A, et al: Pulse pressure, a predictor of long term cardiovascular mortality in a french male population. *Hypertension* 1997;30:1410-1415.
- Chamiot-Clerc P, Renaud JF, Safar ME: Pulse pressure, aortic reactivity, and endothelium dysfunction in old hypertensive rats. *Hypertension* 2001;37:313-321.
- Chen CH, Ting CT, Lin SJ, et al: Which arterial and cardiac parameters best predict left ventricular mass? *Circulation* 1998;98:422-428.
- Cugini P: Compliance e cronoterapia dell'ipertensione arteriosa refrattaria. *Recenti Progressi in Medicina* 1997;88:463-469.

- Cugini P: Trattabilità dell'ipertensione ribelle o resistente mediante cronoterapia antipertensiva personalizzata basata sul monitoraggio ambulatorio della pressione arteriosa. *Recenti Progressi in Medicina* 1996;87:51-57.
- Cuspid C et al: Left ventricular concentric remodeling and carotid structural changes in essential hypertension. *J Hypertens* 1996;14:1441-446.
- Cuspidi C et al: Echocardiographic and ultrasonographic evaluation of cardiac and vascular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Cardiology* 1992;80:305-311.
- Devereux RB, Roman MJ: Left ventricular hypertrophy in hypertension: stimuli, patterns and consequences. *Hypertens Res* 1999;22:1-9.
- Garipey J, Massonneau M, Levenson J, et al: Evidence for in vivo carotid and femoral wall thickening in human hypertension. *Hypertension* 1993;22:111-118.
- Gifford RW Jr: An Algorithm for the management of resistant hypertension. *Hypertension* 1988;11(Suppl II):S101-S105.
- Girerd X, Mourad JJ, Copie X, et al: Noninvasive detection of an increased vascular mass in untreated hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1994;7:1076-1084.
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP: Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 1975;56:56-64.
- Hughes AD et al: Structural changes in the heart and carotid arteries associated with hypertension in humans. *J Hum Hypertens* 1993;7:395-397.
- Kannel WB: Hypertension and other risk factors in coronary heart disease. *Am Heart J* 1987;90:85-91.
- Khattar RS et al. Longitudinal association of ambulatory pulse pressure with left ventricular mass and vascular hypertrophy in essential hypertension. *J Hypertens* 1997;15: 737 – 743.

- Koren MJ et al: Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in men and women with essential hypertension. *Ann Intern Med* 1991;114:345-352.
- Laurent S. Arterial wall hypertrophy and stiffness in essential hypertensive patients. *Hypertension* 1995;26:355-362.
- Leonetti G, Cuspidi C: The heart and vascular changes in hypertension. *J Hypertens* 1995;13(suppl II):S29-S34.
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP: Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *New Eng J Med* 1990;323:1706-1707.
- Luscher TF, Barton M: Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997;20(Suppl II):S3-S10.
- McAlister FA, Lewanczuk RZ, Teo KK: Resistant hypertension: an overview. *Can J Cardiol* 1996;12:822-828.
- Mejia AD, Egan BM, Schork NJ, Zweifler AJ: Artefacts in measurement of blood pressure and lack of target organ involvement in the assesment of patients with treatment-resistant hypertension. *Ann Intern Med* 1990;112:270-277.
- Mitchell GF, Moye LA, Braunwald E, et al: Sphygmomanometrically determined pulse pressure is a powerful independent predictor of recurrent events after myocardial infarction in patients with impaired left ventricular function. *Circulation* 1997;96:4254-4260.
- Mitchell GF, Pfeffer JM, Pfeffer MA: The heart and conduit vessels in hypertension. *Medical Clinics of North America* 1997;6:1247-1271.
- Muiesan MA, Pasini G, Salvetti M, et al: Cardiac and vascular structural changes: Prevalence and relation to ambulatory blood pressure in a middle-aged general population in Northern Italy: The Vobarno Study. *Hypertension* 1996;27:1046-1052.

- Nichols WW, O'Rourke M: McDonald's blood flow in arteries. Theoretical, experimental and clinical principles. 4<sup>th</sup> ed. London/Sydney/Auckland: Arnold E; 1998,pp 54-113,201-222,284-292,374-401.
- Roman MJ et al: Association of carotid atherosclerosis and left ventricular hypertrophy. J Am Coll Cardiol 1995;25:83-90.
- Roman MJ et al:Relation of arterial structure and function to left ventricular geometric patterns in hypertensive adults. J Am Coll Cardiol 1996;28:751-756.
- Safar ME, Blacher J, Mourad JJ, London GM: Stiffness of carotid artery wall material and blood pressure in humans. Stroke 2000;31:782-790.
- Safar ME, Girerd X, Laurent S: Structural changes of large conduit arteries in hypertension. J Hypertens 1996;14:545-555.
- Simon AC, Safar ME, Levenson JA, et al: Systolic hypertension: hemodynamic mechanism and choice of antihypertensive treatment. Am J Cardiol 1979;44:505-511.
- Stergiopoulos N, Meister J-J, Westerhof N: Evaluation of methods for the estimation of total arterial compliance. Am J Physiol 1995;268:H1540-H1548.
- Stergiopoulos N, Meister J-J, Westerhof N: Simple and accurate way for estimating total and segmental arterial compliance: the pulse pressure method. Ann Biomed Eng 1994;22:392-397.
- Stergiopoulos Nikos, Westerhof N: Determinants of pulse pressure. Hypertension 1988;32:556-559.
- The 1988 Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Arch Intern Med 1988;148:1023-38.
- The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. Arch Intern Med 1997;157:2413-2446.

Tice FD et al: Vascular hypertrophy is an early finding in essential hypertension and is related to arterial pressure waveform contour. *Am Heart J* 1996;132:621-627.

Verdecchia P et al: Adverse prognostic significance of concentric remodeling of the left ventricle in hypertensive subjects with normal left ventricular mass. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:871-878.

Wendelhag I et al: Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analyzing system. *Clin Physiol* 1991;11:565-577.