

MARIA LILIAN SALES

**INTERAÇÕES DO POLIMORFISMO -930A/G DA P22PHOX
EM PACIENTES HIPERTENSOS**

CAMPINAS

2006

MARIA LILIAN SALES

**INTERAÇÕES DO POLIMORFISMO -930A/G DA P22PHOX
EM PACIENTES HIPERTENSOS**

*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 Clínica Médica, área de concentração em
Clínica Médica.*

ORIENTADOR: PROF. DR. WILSON NADRUZ JÚNIOR

CAMPINAS

2006

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

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

Sa32i Sales, Maria Lilian
Interações do polimorfismo –930^A/G da P22PHOX em pacientes hipertensos / Maria Lílian Sales. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Wilson Nadruz Júnior
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipertrofia ventricular esquerda. 2. Polimorfismo (Genética).
3. Hipertensão. 4. NADPH oxidase. I. Nadruz Júnior, Wilson.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

Título em inglês : Interactions of p22phox –930A/G polymorphism in hypertensive patients

Keywords: • Hypertrophy, Left Ventricular
• Polymorphism (Genetic)
• Hypertension
• NADPH oxidase

Área de concentração : Clínica Médica

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

Banca examinadora: Prof Dr Wilson Nadruz Júnior

Prof Dr Kleber Gomes Franchini

Prof Dr José Eduardo Tanus dos Santos

Data da defesa: 22-08-2006

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Membros

1. Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior

2. Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

3. Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Curso de Pós Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/08/2006

DEDICATÓRIA

*A meus pais,
por me ensinarem a sonhar*

AGRADECIMENTOS

A meus pais e ao meu irmão pelo amor incondicional e pelo apoio sempre presente.

À minha família, que sempre acreditou em mim, pela torcida.

Ao meu namorado por sua compreensão, torcida e pelo carinhoso apoio técnico e emocional.

Aos colegas do Ambulatório de Cardiologia Molecular e Genética pelo companheirismo, em especial a Maria Carolina Ferreira por sua amizade.

Às colegas Helen e Joseane pela paciência para resolver todas as minhas muitas dúvidas em biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini e Prof. Dr. Lício Augusto Velloso por disponibilizarem a estrutura de seus laboratórios para realização deste estudo.

Aos colegas do Ambulatório de Fisiopatologia Cardiovascular pela generosidade em dividir espaço, equipamentos e amizade.

Aos queridos Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior e Prof. Dra. Roberta Colombo por serem exemplos a ser seguidos, por seu apoio em todos os momentos e por suas valiosas e sempre oportunas palavras de motivação.

*Para ser grande, sê inteiro:
nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és
no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.*

Ricardo Reis

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xiii</i>
ABSTRACT.....	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO	<i>17</i>
1.1- Hipertensão Arterial Sistêmica	<i>18</i>
1.2- Hipertrofia Ventricular Esquerda	<i>19</i>
1.3- Nefropatia Hipertensiva	<i>21</i>
1.4- Stress Oxidativo, HAS e Lesão de Órgão Alvo	<i>22</i>
1.5- Stress Oxidativo	<i>24</i>
2- OBJETIVOS	<i>27</i>
3- MATERIAIS E MÉTODOS	<i>29</i>
3.1- Indivíduos	<i>30</i>
3.2- Exames Laboratorias	<i>30</i>
3.3- Ecocardiograma	<i>31</i>
3.4- Extração de DNA	<i>31</i>
3.5- Amplificação de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase	<i>33</i>
3.6- Digestão de DNA com Endonuclease de Restrição	<i>35</i>

3.7- Análise Estatística	36
4- RESULTADOS	37
5- DISCUSSÃO	45
6- CONCLUSÕES	57
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8- ANEXOS	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ApoE	Apolipoproteína E
AT1	Receptor da Angiotensina 1
AVE	Acidente Vascular Encefálico
DAC	Doença Arterial Coronariana
DdVE	Diâmetro diastólico de Ventrículo Esquerdo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	<i>EthyleneDiamineTetrAcetic acid.</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Alta Densidade)
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance</i> (Índice para avaliação de resistência à insulina)
HVE	Hipertrofia de Ventrículo Esquerdo
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC	Insuficiência Cardíaca
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase</i> (Nicotinamida-

Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato-Oxidase)

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
phox	<i>Phagocytic Oxidase</i> (Oxidase de fagócito)
PPVE	Parede Posterior de Ventrículo Esquerdo
RSB	<i>Reticulocyte Standard Buffer</i> (Tampão Padrão para Reticulócito)
S	Septo Interventricular
SUS	Sistema Único de Saúde
UV	Ultra Violeta
VE	Ventrículo Esquerdo

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1- Características Clínicas e Antropométricas dos indivíduos	38
Tabela 2- Genótipos dos indivíduos estudados	39
Tabela 3- Características Clínicas e Antropométricas dos indivíduos estudados segundo o genótipo	40
Tabela 4- Medicções utilizadas.....	41
Tabela 5- Características Metabólicas e Inflamatórias dos indivíduos estudados.....	42
Tabela 6- Perfil renal dos indivíduos estudados	42
Tabela 7- Parâmetros ecocardiográficos dos indivíduos estudados	43
Tabela 8- Complicações nos indivíduos estudados	44

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Padrão de migração de fragmentos de PCR	34
Figura 2- Padrão de migração de fragmentos após digestão	35



RESUMO

A subunidade p22phox é um componente essencial do complexo enzimático NADPH oxidase, o qual é considerado a principal fonte de produtos do stress oxidativo no sistema cardiovascular. O alelo -930G da p22phox tem sido associado com maior stress oxidativo mediado pela NADPH oxidase e hipertensão arterial. Nós recentemente demonstramos que a hipertrofia do ventrículo esquerdo é acompanhada de aumento na expressão miocárdica de p22phox em ratos submetidos à coarctação da aorta, sugerindo que esta proteína pode estar envolvida em lesões de órgão-alvo induzidas por hipertensão, mais especificamente na hipertrofia cardíaca. Foi pesquisada a prevalência deste polimorfismo em 160 indivíduos acompanhados no Ambulatório de Hipertensão Arterial Sistêmica da UNICAMP, e realizada a correlação desta variante com a massa e geometria ventricular esquerda, lesão renal e perfil metabólico destes pacientes. Não foram encontradas correlações significativas entre este polimorfismo e lesão renal ou estrutural em ventrículo esquerdo. Porém, nos indivíduos com genótipo GG foram encontrados níveis séricos de Triglicérides e de LDL colesterol significativamente mais baixos.



ABSTRACT

The p22phox subunit is an essential component of the NAD(P)H oxidase enzymatic complex, which is considered the major source of oxidative stress products in the cardiovascular system. The -930G allele of *p22-phox* has been associated with higher promoter activity, increased NAD(P)H oxidase-mediated oxidative stress and hypertension. NADPH oxidases have been proved important in the pathogenesis of renal damage in models of hypertension. We recently reported that left ventricular hypertrophy is accompanied by increased myocardial p22-phox expression in aortic-banded rats, suggesting that this protein might be involved in hypertensive cardiac hypertrophy. Thus, the aim of the present report was to investigate the role of p22phox -930A/G polymorphism on cardiac hypertrophy, renal damage and metabolic profile in hypertensive patients. We research the -930A/G polimorfism prevalence in 160 hypertensive subjects from Ambulatory Hypertension Unit - UNICAMP. The follow-up was between 2005 and 2006. The variant -930A/G has not relationship with alterations in ventricular structure and with renal damage markers. However, in GG subjects was associated with lower seric levels of Triglycerides and LDL-cholesterol This finding suggest a association between this variant GG genotype with a best metabolic profile in hypertensives.



1- INTRODUÇÃO

1.1- Hipertensão Arterial Sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) constitui um importante problema de saúde pública, afetando aproximadamente 30 milhões de indivíduos no Brasil e cerca de um bilhão de indivíduos em todo o mundo (OLMOS *et al*, 2002; CHOBANIAN *et al*, 2000). Com o envelhecimento da população, a prevalência desta doença tende a aumentar. Estimativas dos estudos de Framingham indicam que o desenvolvimento de hipertensão arterial é de aproximadamente 90% entre homens e mulheres normotensos na faixa etária de 55 a 65 anos, com sobrevida até a faixa de 80 anos (VASAN *et al*, 2001).

A HAS é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular, explicando 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por doença coronariana (NEAL *et al*, 2000). A correlação entre a pressão arterial e o risco de eventos cardiovasculares é contínua a partir de níveis pressóricos acima de 115/75 mmHg (LEWINGTON *et al*, 2002). Em indivíduos entre 40 e 70 anos, para cada aumento de 20 mmHg na pressão sistólica ou de 10 mmHg na pressão diastólica dobra-se o risco de doença cardiovascular (LEWINGTON *et al*, 2002). Sob esta perspectiva, estima-se que no mundo, cerca de 7,1 milhões de óbitos por ano são atribuídos à HAS. No Brasil, segundo o DATASUS, no ano de 2003, a hipertensão arterial primária foi causa de mais de 110 mil internações e mais de três mil óbitos isoladamente. Entretanto, ao se considerar também as doenças para as quais a HAS é fator de risco, observa-se que estes números são bem maiores. Ao serem somados os dados de mortalidade por insuficiência cardíaca (IC), infarto agudo do miocárdio (IAM) e doença isquêmica do coração, a participação da HAS na taxa de óbito por doenças cardiovasculares passa a ser superior a 50% (BRASIL, 2006).

Os níveis elevados de pressão arterial podem induzir à lesão direta nos órgãos, ou podem atuar como fator secundário na fisiopatogênese dessas lesões, por estimular o desenvolvimento de aterosclerose (KAPLAN, 2002). No coração, a ação direta dos altos níveis pressóricos leva inicialmente à hipertrofia de ventrículo esquerdo podendo progredir para a insuficiência cardíaca. Nos rins, desenvolve-se a nefropatia hipertensiva inicialmente estrutural, que pode progredir para perda funcional e insuficiência renal crônica. No sistema vascular, além das alterações estruturais nas paredes dos vasos, podem ocorrer como eventos mais graves a dissecação de aorta e no sistema nervoso central, o acidente vascular

encefálico hemorrágico e a encefalopatia hipertensiva. Na retina, podem ocorrer exsudatos e hemorragias e, em casos mais graves, papiledema (KAPLAN, 2002; V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2006).

O processo aterosclerótico secundário à hipertensão pode causar alterações isquêmicas em diversos tecidos. No coração manifesta-se pelas síndromes coronarianas agudas e crônicas. No sistema vascular periférico é notada a presença da doença vascular arterial de extremidades e no sistema nervoso central o processo aterosclerótico crônico pode ter como desfecho o acidente vascular encefálico isquêmico, alterações cognitivas e demência vascular. (KAPLAN, 2002; V DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2006).

As complicações mais prevalentes da HAS são a nefropatia hipertensiva e a hipertrofia ventricular esquerda, as quais em sua maioria não apresentam repercussão funcional. Porém o risco de progressão para uma perda funcional acentuada e morte é alto caso não haja controle rigoroso dos níveis pressóricos (KAPLAN, 2002).

1.2- Hipertrofia Ventricular Esquerda

A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é um achado comum na evolução dos pacientes hipertensos. Em pacientes com HAS leve a moderada a incidência de HVE avaliada por índices ecocardiográficos, situa-se entre 12 a 30% em hipertensos não selecionados, e entre 20 a 60% em pacientes avaliados em centros de referência (DEVEREUX *et al*, 1995).

A elevação sustentada da pressão arterial produz um aumento de tensão na parede do ventrículo esquerdo podendo levar a um aumento da massa ventricular e espessamento da parede, por hipertrofia dos cardiomiócitos e proliferação do estroma conjuntivo. Essas alterações são consideradas compensatórias e ocorrem visando normalizar a tensão na parede ventricular (LORELL *et al*, 2000).

Apesar de considerada um fator adaptativo, a HVE é também fator de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular, independente do nível pressórico e de outros fatores de risco (LEVY *et al*, 1990). Em metanálise de 20 estudos envolvendo 48.000 pacientes, encontrou-se risco médio ponderado de morbidade cardiovascular associado à HVE de 2,3 vezes (VAKILI *et al*, 2001). Deve-se considerar também que a hipertrofia cardíaca causada pela hipertensão arterial é o principal fator predisponente para a insuficiência cardíaca (LEVY *et al*, 1996). Este fato assume grande relevância, pois a insuficiência cardíaca está associada a até 50% de mortalidade em cinco anos e representa a principal causa de internação no Sistema Único de Saúde (SUS) a partir dos 65 anos (ARAÚJO *et al*, 2005). O impacto sócio-econômico também pode ser avaliado em um estudo realizado no Reino Unido, o qual estimou um custo anual de US\$ 1.136.000.000 para os 988.000 indivíduos com insuficiência cardíaca que precisaram de tratamento durante o ano de 1995 (STEWART *et al*, 2002).

Embora a sobrecarga pressora seja o principal fator determinante para a HVE e o remodelamento ventricular, fatores como atividade simpática, níveis de neurohormônios, fatores autócrinos e parácrinos, ingestão de sal, o etilismo, a obesidade, o diabetes melitus e o estresse oxidativo também podem contribuir para a variabilidade de massa cardíaca em hipertensos (NADRUZ *et al*, 2001; DHALLA *et al*, 2000). Alguns estudos também têm demonstrado a influência de fatores genéticos no desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda. Filhos normotensos de pais hipertensos têm massa ventricular esquerda maior que filhos de pais normotensos (RAVOGLI *et al*, 1990). Em ratos geneticamente hipertensos, a hereditariedade da massa ventricular esquerda foi estimada em 76% (INNES *et al*, 1998). Neste contexto, genes envolvidos com a estrutura ventricular, hormônios, fatores de crescimento, homeostase do cálcio, pressão arterial e stress oxidativo têm sido apontados como candidatos prováveis para explicar o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (ARNETT, 2000).

1.3- Nefropatia Hipertensiva

A incidência de doença renal crônica em hipertensos é de 156 casos por milhão (MOELLER *et al*, 2002). Apesar da baixa incidência, como a população de hipertensos é grande, o número absoluto de pacientes torna-se expressivo, considerando-se que 25% dos pacientes em hemodiálise apresentam insuficiência renal por nefropatia hipertensiva (ROMÃO JÚNIOR *et al*, 2003). Além disto, a manutenção destes pacientes representa um custo sócio-econômico elevado, visto que o gasto com o programa de diálise e transplante renal no Brasil situa-se ao redor de 1,4 bilhões de reais ao ano (ROMÃO JÚNIOR *et al*, 2004).

Embora a prevalência de doença renal crônica seja pequena em hipertensos, alterações renais discretas, tanto estruturais quanto funcionais, são freqüentemente encontradas nestes indivíduos, mesmo naqueles com elevações mínimas da pressão arterial (BRENNER *et al*, 2004, JOHNSON *et al*, 2002). A lesão histopatológica inicial associada com HAS, a nefrosclerose (hipertrofia e fibrose da camada média das arteríolas pré-glomerulares), é caracterizada hemodinamicamente por hipoperfusão renal, com preservação inicial da Taxa de Filtração Glomerular (BRENNER *et al*, 2004). O fluxo sanguíneo renal total diminui progressivamente, mas a fração de filtração aumenta, permitindo uma preservação temporária da Taxa de Filtração Glomerular (BRENNER *et al*, 2004). Esta circunstância leva a uma maior sensibilidade ao sal, promovendo retenção de sal, aumento na pressão arterial, podendo se acompanhar de microalbuminúria (JOHNSON *et al*, 2002). À medida que a HAS persiste e/ou aumenta, a diminuição progressiva do fluxo sanguíneo renal passa a ser acompanhada por um decréscimo paralelo da Taxa de Filtração Glomerular (BRENNER *et al*, 2004). A albuminúria torna-se clinicamente aparente neste momento, assim como as anormalidades na excreção de sal e água, que são indicativos da presença de glomerulosclerose (perda progressiva da superfície capilar glomerular e fibrose peritubular) (JOHNSON *et al*, 2002). Por outro lado, também há hipertrofia do mesângio e aumento na permeabilidade da membrana basal, contribuindo para a progressão do quadro clínico (BRENNER *et al*, 2004, PESSINA *et al*, 1993).

Vários mecanismos têm sido propostos para justificar o desenvolvimento da nefropatia hipertensiva. Estes incluem: o aumento do estresse mecânico secundário à elevação dos níveis pressóricos promovendo alterações estruturais e funcionais das células renais; a liberação autócrina e parácrina de fatores de crescimento e peptídeos vasoativos como Endotelina e *Transforming Growth Factor-Beta*; a produção local de mediadores inflamatórios; e a ativação do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (FOGO *et al*, 2001; ROSARIO *et al*, 2006).

Fatores genéticos têm sido implicados no desenvolvimento de insuficiência renal em hipertensos. Estudos epidemiológicos observaram uma segregação familiar de insuficiência renal em afro-americanos (FREEDMAN *et al*, 1993). Por outro lado, diversos polimorfismos genéticos foram correlacionados com a insuficiência renal em hipertensos, especialmente genes que codificam componentes do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (FOGO *et al*, 2001).

1.4- Stress Oxidativo, HAS e Lesão de Órgão Alvo.

Diversos estudos experimentais trazem fortes evidências de que espécies reativas do oxigênio iniciam ou mantêm a hipertensão arterial. Ratos que tiveram aumento do stress oxidativo pela adição de chumbo em sua água apresentaram elevação significativa dos seus níveis pressóricos (VAZIRI *et al*, 1999). Neste estudo, a administração de altas doses de vitamina E, utilizada como antioxidante, promoveu normalização dos níveis pressóricos assim como redução na produção de espécies reativas de oxigênio. Em outro trabalho, a administração de butionina-sulfoximina, um inibidor da glutatona-sintase induziu a um aumento da pressão arterial em ratos. Porém, quando a butionina-sulfoximina foi administrada juntamente com antioxidantes, houve manutenção dos níveis pressóricos em valores considerados normais (VAZIRI *et al*, 2000). Além disto, a transfecção do gene da superóxido dismutase em ratos espontaneamente hipertensos levou a uma redução dos níveis pressóricos (CHU *et al*, 2003).

Alguns estudos clínicos demonstraram que seres humanos com HAS têm uma capacidade antioxidante diminuída, o que pode ter importância na fisiopatogênese desta doença. (RUSSO *et al*, 1998; CERIELLO *et al*, 1991). Outros grupos têm investigado o efeito da suplementação de antioxidantes (principalmente vitamina C) sobre os níveis pressóricos, porém os resultados têm sido conflitantes. A suplementação de ácido ascórbico (vitamina C) mostrou-se ser eficaz na redução dos níveis pressóricos em 48 indivíduos com HAS (DUFFY *et al*, 1999). Entretanto, outro *trial* randomizado não encontrou efeito entre a suplementação de vitamina C sobre os níveis pressóricos em 244 pacientes hipertensos (KIM *et al*, 2002).

Além da possível atuação na fisiopatogênese da hipertensão arterial, o stress oxidativo também parece exercer importante papel nas lesões de órgãos alvo, principalmente em relação à HVE e ao dano renal. Espécies reativas do oxigênio podem induzir a maioria das mudanças que contribuem para o remodelamento do miocárdio: hipertrofia de miócitos, apoptose, expressão de genes fetais e aumento da atividade da matrix de metaloproteinase (SAWYER *et al*, 2002). De maneira análoga, miócitos cardíacos isolados de ratos apresentaram hipertrofia quando submetidos à inibição da superóxido dismutase *in vitro* (SIWIK *et al*, 1999). Cardiomiócitos isolados submetidos a estiramento mecânico apresentaram aumento na produção de espécies reativas do oxigênio e hipertrofia do miócitos, efeitos estes que foram inibidos pela administração de N-acetilcisteína e N-2-mercaptopropionil-glicina, que são substâncias neutralizadoras de radicais livres (AIKAWA *et al*, 2001), indicando que o estresse oxidativo pode exercer um papel fundamental na hipertrofia cardíaca relacionada à sobrecarga hemodinâmica.

Em ratos submetidos à sobrecarga pressora por coarctação da aorta houve o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e maior expressão miocárdica das subunidades p22phox e p67phox da NADPH oxidase, considerada a principal fonte de superóxido no sistema cardiovascular (NADRUZ JÚNIOR *et al*, 2004). Neste estudo, o tratamento com Sinvastatina (também reconhecida por seus efeitos antioxidantes) após a coarctação promoveu a redução da expressão das subunidades p22phox e p67phox assim como a diminuição da hipertrofia cardíaca nos animais coarctados (NADRUZ JÚNIOR *et al*, 2004).

O papel do stress oxidativo na fisiopatologia da nefropatia hipertensiva tem sido estudado em ratos e, mais recentemente em humanos (MANNING JÚNIOR *et al*, 2005). Neste contexto, algumas evidências demonstraram que ratos sal-sensíveis com aumento de sódio na dieta evoluíram com dano renal significativo em paralelo ao aumento do stress oxidativo local (MENG *et al*, 2002, TROLLIET *et al*, 2001).

Os mecanismos de ação do stress oxidativo na progressão do dano renal ainda permanecem pouco esclarecidos, porém a presença aumentada de espécies reativas do oxigênio neste órgão e a melhora da lesão renal com administração de substâncias antioxidantes (vitaminas C e E) dão suporte à idéia de que o estresse oxidativo pode ser um importante mecanismo fisiopatogênico na nefropatia hipertensiva (ZOU *et al*, 2001; TIAN *et al*, 2005).

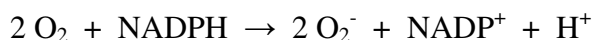
1.5- Stress Oxidativo e NADPH oxidase

Fontes de espécies reativas do oxigênio

Vários sistemas enzimáticos produzem espécies reativas do oxigênio no sistema cardiovascular: cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, xantina oxidase, óxido-nítrico-sintase, NADPH-oxidase, lipo-oxigenase, heme-oxigenase e citocromo p450 mono-oxigenase (GRIENDLING *et al*, 2000). Entretanto, o sistema NADPH oxidase tem sido considerado a principal fonte de espécies reativas do oxigênio no sistema cardiovascular (MOHAZZAB *et al*, 1994).

NADPH Oxidase

As NADPH oxidases são um grupo de enzimas membrano-associadas encontradas em células de origem mesodérmica. As mais estudadas são as encontradas nos neutrófilos que catalisam a produção de superóxido (O_2^-) pela redução do oxigênio usando a NADPH como doadora de elétron (BABIOR, 1999):



Nestas células, o superóxido produzido é usado para destruir microorganismos invasores. Por outro lado, uma NADPH oxidase similar àquela encontrada nos fagócitos pode ser encontrada em células endoteliais, fibroblastos, células da musculatura vascular, cardiomiócitos, condrócitos, hepatócitos. Nestes tecidos, a oxidase é fonte de segundos mensageiros (BABIOR, 1999).

A estrutura e função da NADPH oxidase foi primeiramente descrita e caracterizada em neutrófilos. O sistema é composto por dois componentes trans-membrana: gp91 phox (phox de *phagocytic oxidase*) e p22phox, e por quatro unidades citoplasmáticas: p47phox, p67phox, p40phox e Rac (LASSEGUE *et al*, 2003). Quando ativada, a subunidade citossólica p47phox é fosforilada e se une às outras subunidades citoplasmáticas. Esse complexo migra e ativa as unidades trans-membrana (LASSEGUE *et al*, 2003; CAI *et al*, 2003).

Embora as NADPH oxidases não-fagocíticas sejam muito similares às NADPH oxidases de fagócitos, existem algumas diferenças entre elas. A produção de espécies reativas de oxigênio das não-fagocíticas ocorre continuamente e em baixas taxas, enquanto a produção na NADPH-oxidase dos fagócitos ocorre em picos e em altíssimas quantidades. Ademais, a ativação da enzima em fagócitos ocorre em segundos, enquanto que nas outras células ocorre de minutos a horas (LASSEGUE *et al*, 2003; CAI *et al*, 2003).

A NADPH oxidase tem sido implicada em diversas doenças cardiovasculares e o seu envolvimento na aterosclerose, hipertrofia e insuficiência cardíaca vem sendo cada vez mais estudado (GRIENDLING *et al*, 2000). Neste contexto, a subunidade p22phox parece exercer um papel importante na ativação deste sistema enzimático, estando sua expressão aumentada em situações de sobrecarga hemodinâmica e lesões cardiovasculares (GRIENDLING *et al*, 2000; NADRUZ JÚNIOR *et al*, 2004).

Polimorfismos da p22-phox

Diversos polimorfismos envolvendo a subunidade p22phox foram descritos na literatura, e têm sido relacionados ao desenvolvimento de HAS e aterosclerose. Recentemente foram caracterizados cinco polimorfismos associados à subunidade p22phox

em ratos espontaneamente hipertensos (ZALBA *et al*, 2001). Em humanos, foram descritas as variações gênicas C242T, C549T, G508A, A640G e A-930G (INOUE *et al*, 1998, SAN JOSÉ *et al*, 2004). O polimorfismo mais estudado tem sido o C242T, que apresenta resultados controversos em relação à sua associação com aterosclerose, doença arterial coronária (SCHÄCHINGER *et al*, 2001) e acidente vascular cerebral (ITO *et al*, 2000). Recentemente a presença da variante genética C242T foi associada à HAS (MORENO *et al*, 2006).

Em 2003, Moreno *et al* ao sequenciar a região promotora do gene humano que codifica a proteína p22phox, encontraram um polimorfismo A/G em sua posição -930. Este estudo demonstrou também que a transfecção do alelo -930G em células musculares lisas de ratos aumentou em 30% a atividade do promotor da p22phox (MORENO *et al*, 2003). Posteriormente, demonstrou-se que a presença do genótipo GG estava relacionada a um aumento da atividade da enzima NADPH-oxidase em leucócitos apenas em indivíduos hipertensos, mas não em normotensos. (SAN JOSÉ *et al*, 2004). Ademais, uma frequência maior do genótipo GG também foi encontrada em indivíduos hipertensos, sugerindo que o alelo G pode estar associado ao desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica. (MORENO *et al*, 2003, KOKUBO *et al*, 2005).

Como o maior stress oxidativo e a maior expressão de p22phox podem estar associadas a maior lesão de órgão alvo na HAS, a proposta do presente estudo é de investigar a associação do polimorfismo -930AG da subunidade p22phox com alterações cardíacas e renais em pacientes hipertensos, além de observar suas possíveis correlações com perfil metabólico e inflamatório nestes indivíduos.



2- OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

1. Avaliar a prevalência do polimorfismo -930A/G da p22phox em pacientes hipertensos.
2. Correlacionar a presença deste polimorfismo a alterações da estrutura de ventrículo esquerdo, marcadores de função e lesão renal e ao perfil metabólico em indivíduos com hipertensão arterial sistêmica.



3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Indivíduos

Cento e sessenta pacientes portadores de HAS acompanhados no Ambulatório de Cardiologia Genética e Molecular e no Ambulatório de Hipertensão Arterial Sistêmica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foram selecionados para o estudo no período de janeiro de 2005 e junho de 2006. Os indivíduos incluídos foram de ambos os sexos, nascidos no Brasil, e com idade superior a 18 anos.

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, protocolo número 425/2005, sendo que os pacientes foram incluídos apenas após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido ou após terem o termo assinado por seus responsáveis, na impossibilidade de fazê-lo (ANEXO 1).

Após inclusão no estudo, os pacientes foram submetidos à avaliação antropométrica, clínica, laboratorial, ecocardiográfica e à caracterização genética quanto ao polimorfismo -930A/G da p22phox.

3.2- Exames Laboratorias

Para a realização de dosagem bioquímica, foram utilizados os seguintes métodos: Radioimunoensaio para insulina (KIT RIA); Método enzimático da glicose oxidase para glicemia (KIT WIERNER); e Ensaio colorimétrico enzimático para bioquímica em geral.

A resistência à insulina foi estimada utilizando-se o índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*), calculado através da fórmula (MATTHEWS et al, 1985):

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \text{Insulinemia } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Glicemia (mmol/litro)} / 22.5$$

O Clearance de creatinina (ml/min/1,73m^2) foi calculado a partir dos valores de creatinina sérica e urinária através da seguinte fórmula: Creatinina Urinária (mg%) x Volume Urinário (ml em 24h) / [Creatinina Sérica (mg%)*1440]. (KESTELOOT et al, 1996).

3.3- Ecocardiograma

Os indivíduos tiveram estrutura ventricular esquerda avaliada através de realização de ecocardiograma, em modo M, por único observador, utilizando-se corte bidimensional paraesternal, ao nível do eixo longo do VE, de acordo com as recomendações do “Committee on M-mode Standardization of Echocardiography” (SAHN *et al*, 1978).

Para o cálculo da massa do ventrículo esquerdo foi utilizada a fórmula preconizada pela American Society of Echocardiography: $\text{Massa VE} = 1,04 [(DdVE + S + PPVE)^3 - DdVE^3] - 14$ (DEVEREUX *et al*, 1977).

A massa do ventrículo esquerdo foi indexada pela altura^{2,7} para cálculo do índice de massa ventricular, já que este índice é mais adequado para avaliação da massa de VE em indivíduos obesos (DE SIMONE *et al*, 1992).

3.4- Extração de DNA

Foi retirada amostra de sangue de cada paciente por ocasião da realização dos exames laboratoriais destes pacientes (8 ml de sangue em dois tubos de coleta com EDTA). A partir desta alíquota foi realizada a extração de DNA usando-se o protocolo que se segue (MOORE *et al*, 1998):

Lise de Células

1. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente.
2. O plasma, que estava na fase de cima, foi desprezado. A fase que estava embaixo no tubo contendo as células foi utilizada..
3. Acrescentou-se RSB 1x até completar-se um volume total de 11ml no tubo Falcon. Foram ainda adicionadas 6 gotas de Nonidet-P40.

4. Procedeu-se à homogeneização por 10 minutos e posterior centrifugação da mistura por 10 minutos a 2500 rpm.
5. Após a centrifugação formou-se *pellet* que estava preso ao fundo do tubo Falcon. Desprezou-se o conteúdo, menos o *pellet*.
6. Adicionou-se a esse *pellet* 3 ml de SDS e 0,5 ml de RSB 1x, ressuspensando o *pellet* nessa solução.
7. Adicionou-se 80 µl de Proteinase K (100 µg/ml).
8. Essa solução foi mantida em estufa a 37°C por 12 horas, e posteriormente em temperatura ambiente por 1 a 4 semanas.

Extração pelo método do fenol-clorofórmio

Após a etapa de lise das células do sangue, o DNA foi extraído seguindo o protocolo a seguir:

1. Adicionou-se 2ml de fenol à mistura obtida com a lise.
2. Procedeu-se à homogeneização por 10 minutos e posterior centrifugação da mistura por 10 minutos a 2500 rpm.
3. Após a centrifugação evidenciaram-se três fases: a superior mais transparente, a do meio, leitosa e de menor volume e a inferior avermelhada.
4. Separou-se a fase transparente em novo tubo, desprezando-se as duas inferiores.
5. Adicionou-se a essa fase 1,5 ml de fenol e 1,5 ml de clorofórmio, homogeneizando-se por 10 minutos e realizando centrifugação por 10 minutos a 2500 rpm.
6. Novamente formaram-se três fases. Separou-se a fase superior transparente e desprezaram-se as outras duas.

7. Adicionou-se 1,5 ml de solução de clorofórmio com álcool isoamílico.
8. Procedeu-se à nova homogeneização por 10 minutos e posterior centrifugação da mistura por 10 minutos a 2500 rpm.
9. Repetiu-se a retirada da fase superior transparente para novo tubo Falcon. Adicionou-se álcool etílico 100% até completar-se um volume final de 9ml. O DNA foi precipitado no álcool. Transferiu-se o DNA precipitado para um tubo *Eppendorff*.
10. Centrifugou-se por 3 minutos a 12000 rpm.
11. Formou-se um *pellet* preso ao fundo do tubo. Desprezou-se o álcool 100% e acrescentou-se 0,5 ml de álcool 70% para eliminar resíduos de sal.
12. Centrifugou-se novamente por 3 minutos a 12000 rpm.
13. Foi descartado o álcool 70%. O *pellet* resultante foi ressuspenso em água *milliQ* estéril.

Eletroforese em gel de agarose

O protocolo foi dividido em três estágios: (1) um gel com 2% de agarose foi preparado; (2) amostras de DNA foram colocadas no gel e submetidas a uma a 120 Volts; (3) o gel foi corado em solução de brometo de etídeo, visualizado e fotografado mediante uso de transiluminador com lâmpada UV. (VOYTAS *et al*, 1998).

3.5- Amplificação de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica da reação da polimerase em cadeia foi realizada em um termociclador automático PTC-100 (Programable Thermal Controler), seguindo protocolo descrito por SAIKI *et al*, 1985:

200 ng de DNA genômico, 10mM Tris-HCl pH 8,5, 2mM de MgCl₂, 1,0mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 0,5 µg de cada *primer*, 1,5 U de *Taq* polimerase, para um volume final de 50µl.

As amostras foram desnaturadas inicialmente por 3 minutos a 94°C, em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação por 30 segundos a 94°C, hibridização a 60°C por 30 segundos e alongamento a 72°C por 30 segundos. Finalmente realizou-se uma última etapa de extensão a 72°C por 5 minutos.

Os *primers* utilizados para a amplificação da região estudada foram:

5' – TCT GCA CCC TGC TAC CAA GGA C – 3'

5' – GGA AAC CAC CAA GTG CCT CGG ATG G – 3'

As reações de PCR objetivavam amplificar um fragmento de 650 pb na região promotora da p22phox (MORENO *et al*, 2003).

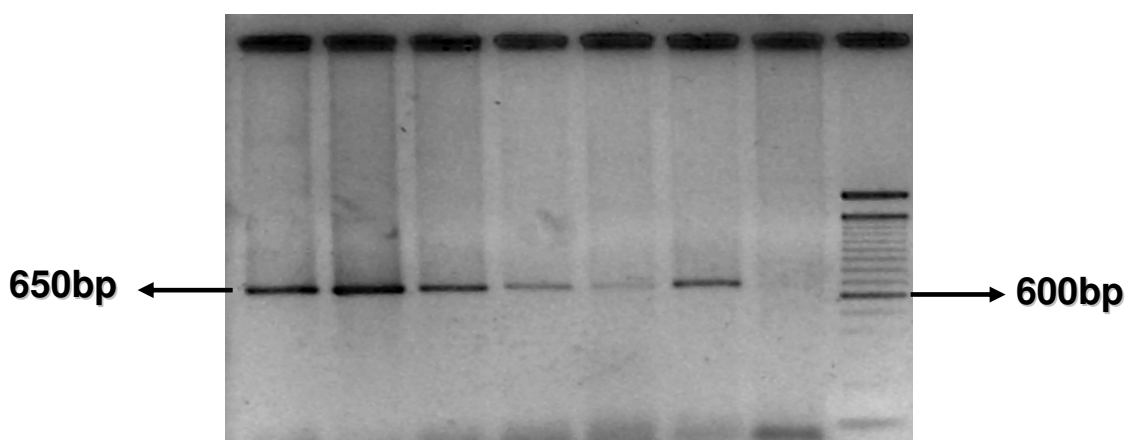


Figura 1- Padrão de migração de fragmentos de PCR

3.6- Digestão de DNA com Endonuclease de Restrição

1. Adicionaram-se 16 μ l do produto obtido com reação da polimerase em cadeia a 2 μ l do tampão de restrição e a 0,5 μ l de enzima de restrição (1 U/ μ g DNA). A enzima usada foi a Bbv I (MORENO et al, 2003).
2. Incubou-se essa mistura a 37°C por 12 horas.
3. A reação foi finalizada por inativação da enzima a uma temperatura de 65°C por 20 minutos.
4. O produto da digestão foi visualizado em eletroforese em gel de agarose 2%.
5. A digestão produziu fragmentos de 504, 85, 57 e 15 *bp* para o alelo G e fragmentos de 589, 57 e 15 *bp* para o alelo A.

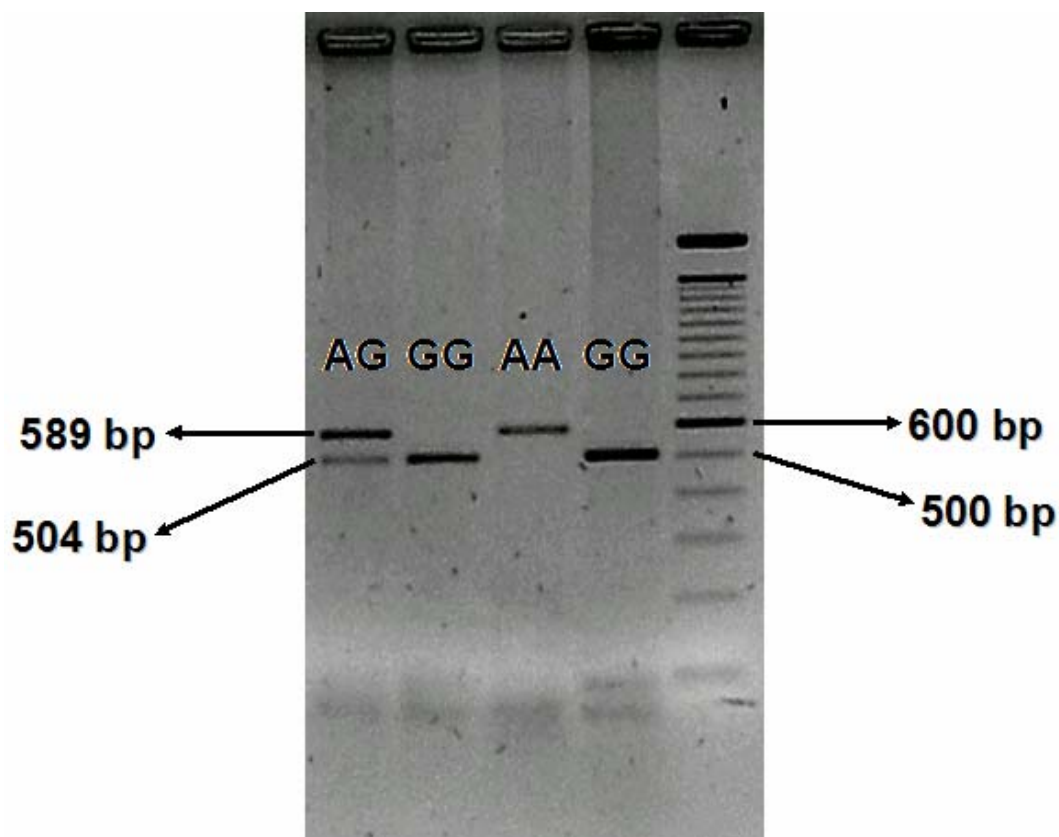


Figura 2- Padrão de migração de fragmentos após digestão

3.7- Análise Estatística

As variáveis contínuas estão representadas por média $\pm$ Erro Padrão. A significância estatística das diferenças foi analisada pelo teste U de Mann-Whitney. A comparação entre as variáveis categóricas foi feita pelo teste χ^2 .



4- RESULTADOS

A Tabela 1 mostra as características antropométricas e clínicas dos pacientes selecionados. Dos 160 pacientes estudados, 61% eram do sexo feminino e a média de idade foi de 57 anos. As médias de Índice de massa corpórea (IMC) e de circunferência abdominal foram respectivamente de 30 kg/m² e 102 cm, demonstrando que esta população apresentava alta prevalência de sobrepeso/obesidade central. Apenas 25 indivíduos (15%) dos pacientes apresentaram IMC entre 20 e 25 kg/m², considerado normal.

Tabela 1- Características Clínicas e Antropométricas dos indivíduos

TOTAL	N=160
Gênero (M / F)	62 / 98
Idade (anos)	57 ± 1
Índice de Massa Corpórea (kg/m²)	30 ± 0,4
Circunferência Abdominal (cm)	102 ± 1,1
Diabéticos, n (%)	27 (17%)
Tabagistas, n (%)	21 (13%)
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	145 ± 1,9
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	89 ± 1,2
Pressão de Pulso (mmHg)	56 ± 1,4

Para variáveis contínuas, os valores descritos referem-se à Média $\pm$ Erro padrão

Para variáveis categóricas, os valores descritos correspondem ao número absoluto de indivíduos e sua porcentagem.

Quanto à presença do polimorfismo -930A/G da p22phox, 32 pacientes apresentaram o genótipo AA, 61 AG e 67 GG. Essa distribuição genotípica não se enquadrou no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Uma possível explicação para esse achado pode estar na seleção da nossa amostra, pois nosso estudo avaliou apenas hipertensos e o genótipo GG tem-se correlacionado com a hipertensão arterial (Zalba *et al*, 2001). Assim, é

possível especular que a maior prevalência de GG e o conseqüente desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg possam ser demonstração de que este genótipo é um marcador de HAS. Outra hipótese seria de que este resultado é secundário a um erro de genotipagem. Para avaliar esta hipótese repetimos as reações de digestão com enzima de restrição, as quais não forneceram resultados diferentes. Não se pode descartar também a possibilidade de tratar-se de coincidência, visto que o tamanho da amostra estudada é pequeno (**Tabela 2**).

Tabela 2- Genótipos dos indivíduos estudados

GENÓTIPO	N
AA	32 (20%)
AG	61 (39%)
GG	67 (41%)
TOTAL	160 (100%)

Valores correspondem ao número absoluto de indivíduos e suas porcentagens.

A partir de evidências prévias da literatura que demonstraram que o genótipo GG é fenotipicamente distinto em relação aos genótipos AA e AG em hipertensos (SAN JOSE *et al*, 2004), agrupamos esses dois genótipos, ficando os indivíduos estudados divididos em AA/AG (93 indivíduos) e GG (67 indivíduos).

Quanto às características clínicas, não houve diferença estaticamente significativa para gênero, idade, IMC, Circunferência Abdominal, prevalência de diabetes, tabagismo e níveis pressóricos (**Tabela 3**).

Tabela 3- Características Clínicas e Antropométricas dos indivíduos estudados segundo o genótipo

Parâmetro	AA/AG (N = 93)	GG (N = 67)	P
Gênero (M / F)	35 / 58	27 / 40	NS
Idade (anos)	58 ± 1,5	56 ± 1,6	NS
Índice de Massa Corpórea (kg/m²)	30 ± 0,5	30 ± 0,6	NS
Circunferência Abdominal (cm)	102 ± 1,4	102 ± 1,7	NS
Diabéticos (n / %)	15 (16)	12 (18)	NS
Tabagistas (n / %)	14 (15)	7 (10)	NS
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	146 ± 2,8	143 ± 2,5	NS
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	89 ± 1,7	88 ± 1,6	NS
Pressão de Pulso (mmHg)	57 ± 1,8	55 ± 2	NS
Tempo de HAS	14 ± 1,4	12 ± 1,6	NS

Para variáveis contínuas, os valores descritos referem-se à Média $\pm$ Erro padrão

Para variáveis categóricas, os valores descritos correspondem ao número absoluto de indivíduos e sua porcentagem.

A maioria dos pacientes fazia uso de medicação anti-hipertensiva (89% dos indivíduos do grupo AA/AG e 92% do grupo GG). Não houve diferença significativa entre o uso das diversas classes de anti-hipertensivos, de estatinas ou de fibratos entre os dois grupos estudados (**Tabela 4**).

Tabela 4- Medicções utilizadas

Medicção	AA/AG (N = 93)	GG (N = 67)	<i>P</i>
Anti-Hipertensivos	83 (89%)	62 (92%)	NS
Diuréticos	77 (81%)	48 (71%)	NS
IECA	72 (77%)	50 (74%)	NS
β - Bloqueadores	54 (57%)	25 (37%)	NS
Bloqueadores Canal de Cálcio	38 (40%)	29 (43%)	NS
α - Bloqueadores	10 (10%)	5 (7%)	NS
Vasodilatadores	4 (4%)	4 (6%)	NS
Estatinas	29 (30%)	16 (23%)	NS
Fibratos	2 (2%)	1 (1%)	NS

Valores correspondem ao número absoluto de indivíduos e suas porcentagens.

Quanto ao perfil metabólico e inflamatório dos indivíduos, não houve diferença estatística entre os dois subgrupos quanto aos níveis séricos de glicemia de jejum e insulina, assim como do índice HOMA-IR e proteína C reativa. Porém, houve diferença significativa entre os níveis de triglicérides e de LDL-colesterol, com níveis mais baixos encontrados no subgrupo de genótipo GG. A análise dos níveis séricos de LDL-colesterol foi refeita após retirada dos pacientes em uso de estatinas e revelou manutenção da diferença estatística entre os grupos. Os dados de perfil metabólico estão na **Tabela 5**.

Tabela 5- Características Metabólicas e Inflamatórias dos indivíduos estudados

Parâmetro	AA/AG (N = 93)	GG (N = 67)	P
Glicemia Jejum (mg/dL)	103 ± 2,5	103 ± 4,2	NS
Insulinemia (mUI/mL) *	16 ± 1,7	12 ± 0,9	NS
HOMA *	4,4 ± 0,6	3,2 ± 0,4	NS
Colesterol Total (mg/dL)	198 ± 4,2	187 ± 5,2	NS
Tiglicérides (mg/dL)	157 ± 9,7	130 ± 8,4	0,02
LDL (mg/dL)	123 ± 4	111 ± 4,8	0,04
LDL (mg/dL) **	129 ± 5	111 ± 5	0,01
HDL (mg/dL)	52 ± 1,4	51 ± 1,7	NS
Proteína C Reativa (mg/dL)	0,70 ± 0,12	0,59 ± 0,09	NS

Valores descritos sob forma de Média $\pm$ Erro padrão

* n=100 (com dosagem de insulinemia), **n=115 (sem pacientes que usam estatinas)

Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos em relação à função renal e grau de albuminúria (**Tabela 6**).

Tabela 6- Perfil renal dos indivíduos estudados

Parâmetro	AA/AG (N = 93)	GG (N = 67)	
Uréia (mg/dL)	35 ± 1,2	33 ± 1,8	NS
Creatinina (mg/dL)	0,97 ± 0,03	1,05 ± 0,06	NS
Albumina/Creatinina na Urina (g/g)	0,99 ± 0,3	1,0 ± 0,4	NS
Clearance de Creatinina (ml/min)	85,2 ± 3,1	87,5 ± 4,6	NS

Valores descritos sob forma de Média $\pm$ Erro padrão

Em relação às medidas estruturais do ventrículo esquerdo, também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os valores dos dois subgrupos (**Tabela 7**).

Tabela 7- Parâmetros ecocardiográficos dos indivíduos estudados

Parâmetro	AA/AG (N = 93)	GG (N = 67)	P
Massa VE (g)	276 ± 10	264 ± 12	NS
Massa VE / Alt^{2,7} (g/m^{2,7})	79 ± 3	74 ± 3	NS
Septo (mm)	11,3 ± 0,2	11 ± 0,2	NS
Parede Posterior VE (mm)	11,1 ± 0,2	10,8 ± 0,2	NS
Diâmetro Diastólico Final VE (mm)	50 ± 0,7	49,8 ± 0,7	NS
Espessura Relativa do VE	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,01	NS
Átrio Esquerdo (mm)	39,4 ± 0,7	39,1 ± 0,8	NS

Valores descritos sob forma de Média $\pm$ Erro padrão

Por fim, foi investigada também a prevalência de complicações vasculares secundárias à aterosclerose nestes pacientes. Foram incluídos no grupo com doença arterial coronariana pacientes que apresentaram infarto agudo do miocárdio, revascularização prévia, angina com coronariopatia documentada por exame funcional (cintilografia, ecocardiografia de stress) ou estrutural (cateterismo). Foram relacionados também os pacientes que apresentaram acidente vascular encefálico isquêmico prévio e história de aneurisma ou dissecção de aorta. Não foi encontrada diferença significativa na incidência destas complicações entre os dois grupos (**Tabela 8**).

Tabela 8- Complicações nos indivíduos estudados

Complicação	AA/AG (N = 93)	GG (N = 67)	<i>P</i>
Doença Arterial Coronária	16 (17%)	6 (9%)	NS
Acidente Vascular Encefálico Isquêmico	10 (11%)	3 (4%)	NS
Aneurisma/Dissecção de Aorta	3 (3,2%)	4 (6%)	NS

Valores descritos sob forma de Média $\pm$ Erro padrão



5- DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo foram: 1) o polimorfismo -930A/G da p22phox não se associa a alterações estruturais no ventrículo esquerdo ou a marcadores de lesão renal em indivíduos hipertensos; 2) o genótipo GG da variante -930A/G correlaciona-se com níveis séricos menores de triglicérides e LDL-colesterol em comparação aos genótipos AA/AG em hipertensos. De maneira geral, estes resultados sugerem que o genótipo GG, apesar de estar associado ao maior desenvolvimento de HAS (MORENO *et al*, 2003; KOKUBO *et al*, 2005), pode se correlacionar com um melhor perfil metabólico em indivíduos com HAS.

Polimorfismo -930A/G e lesão de órgão-alvo

Estudos prévios demonstraram que leucócitos de indivíduos que expressam o genótipo GG do polimorfismo -930A/G da p22phox produzem maior quantidade de superóxido quando estimulados com phorbol-12-myristato-13-acetato, em comparação àqueles obtidos de indivíduos portadores dos genótipos AA/AG (SAN JOSE *et al*, 2004). Curiosamente, esta diferença na produção de superóxido foi detectada apenas em indivíduos hipertensos, mas não em normotensos, indicando que tecidos que expressam o genótipo GG poderiam estar expostos a maior estresse oxidativo sob condições de sobrecarga pressora ou hemodinâmica. Com base em evidências prévias demonstrando que o estresse oxidativo está implicado na patogênese das lesões de órgão-alvo por HAS (CIFUENTES *et al*, 2006; NADRUZ JÚNIOR *et al*, 2004) e que a p22-phox é expressa em tecidos cardíacos, renais e vasculares em seres humanos (JONES *et al*, 1995; HEYMES *et al*, 2003; CIFUENTES *et al*, 2006), nós investigamos se este polimorfismo “pró-oxidativo” poderia influenciar o desenvolvimento de lesões cardíacas e renais induzidas pela HAS. Contrariando esta hipótese, nossos resultados mostraram que o polimorfismo -930A/G da p22phox não afeta a massa e geometria ventricular, assim como o desenvolvimento de proteinúria e a perda de função renal em hipertensos.

Algumas explicações podem ser levantadas para justificar a ausência de associação entre o polimorfismo e lesões de órgão-alvo por HAS. Em primeiro lugar, é válido ressaltar que mais de 90% dos pacientes estavam em uso de medicações anti-hipertensivas. As classes de drogas anti-hipertensivas, assim como seus respectivos tempos de utilização, poderiam influenciar de forma diferenciada a progressão de lesões de órgãos-alvo em hipertensos, atuando de maneira independente sobre a massa ventricular e rins (OGDEN *et al*, 2000; DÍEZ *et al*, 2001). Apesar de não termos quantificado o tempo de utilização de cada classe de medicação, não observamos diferenças significativas na frequência de uso de anti-hipertensivos entre os genótipos estudados, tornando menos provável a influência destas medicações sobre os nossos resultados. Por outro lado, os grupos genotípicos apresentaram valores similares para idade, IMC, circunferência abdominal, níveis de pressão arterial, tempo de HAS assim como prevalência de diabetes mellitus e tabagismo, os quais são fatores que também podem modular as lesões de órgão-alvo por HAS.

Algumas evidências têm sugerido que a NADPH-oxidase pode ser estrutural e geneticamente distinta de acordo com o tecido analisado. Em ratos, foi descrito que a NADPH-oxidase expressa em leucócitos é distinta daquela expressa em aortas, indicando que dados funcionais em leucócitos podem não ser representativos da expressão e atividade da NADPH-oxidase em outros tecidos (SOUZA *et al*, 2001). Em humanos, contudo, evidências recentes têm demonstrado que polimorfismos da p22-phox são ativos em tecidos vasculares e fagócitos (CAHILLY *et al* 2000; MORENO *et al*, 2006), sugerindo que variantes deste gene são funcionais no sistema cardiovascular.

Outro aspecto importante a ser considerado refere-se ao fato de que a atividade dos produtos de polimorfismos da p22-phox pode ser afetada por características étnicas da população estudada, produzindo fenótipos até antagônicos. Por exemplo, o alelo C do polimorfismo 242C/T da p22-phox está associado com maior atividade da NADPH-oxidase e aterosclerose em caucasianos (CAHILLY *et al* 2000; GUZIK *et al*, 2000), enquanto que o alelo T se correlaciona com estes mesmos fenótipos em populações japonesas (ITO *et al*, 2000; SHIMO-NAKANISHI *et al*, 2004) . Desta forma, é possível que a repercussão funcional de variantes da p22-phox não se reproduza em populações distintas.

No nosso estudo, não fizemos avaliação funcional dos diferentes genótipos da variante -930A/G. Entretanto, a alta prevalência de -930GG (41%) encontrada em nossa população de hipertensos sugere uma correlação deste genótipo com a HAS, o que está de acordo com observações obtidas em populações de europeus e japoneses portadores de HAS (MORENO *et al*, 2003; KOKUBO *et al*, 2005).

Polimorfismo -930A/G e Perfil Lipídico

Nosso estudo mostrou que o genótipo GG se correlaciona com níveis séricos menores de Triglicérides e LDL-Colesterol em comparação aos genótipos AA/AG. Pouco se sabe sobre o efeito do polimorfismo -930A/G da p22phox no perfil lipídico e metabólico, sendo que apenas um estudo prévio abordou este tópico. Moreno *et al.* demonstraram que esta variante não se associou a diferenças nos níveis lipídicos em uma amostra de 88 indivíduos hipertensos (MORENO *et al*, 2003). É válido ressaltar, contudo, que nesta população houve uma tendência a menores níveis séricos de triglicérides nos indivíduos portadores de alelo GG, sugerindo uma possível influência do polimorfismo -930A/G sobre o perfil lipídico.

Evidências obtidas com outro polimorfismo funcional da p22phox, o 242C/T, têm fornecido dados contraditórios. Em japoneses, o alelo T correlacionou-se com maior produção de superóxido em leucócitos (SHIMO-NAKANISHI *et al*, 2004). Contudo, japoneses saudáveis com o genótipo CC apresentaram maiores níveis de LDL-pequena e densa, assim como maior resistência à insulina (HAYAISHI-OKANO *et al*, 2002), sugerindo que a presença do alelo T pode estar associada a um melhor perfil metabólico. Por outro lado, em caucasianos, o alelo C tem sido correlacionado com maior atividade da NADPH-oxidase, porém sem associações com modificações do perfil lipídico (CAHILLY *et al*, 2000; MORENO *et al*, 2006).

A razão para termos encontrado valores séricos menores de Triglicérides entre os indivíduos portadores de GG não está clara. Uma explicação poderia ser o fato de que a maioria dos indivíduos incluídos no estudo estava em uso de medicações que podem interferir na resistência à insulina e conseqüentemente nos níveis de triglicérides, como Diuréticos, Beta-Bloqueadores e Inibidores da ECA / Bloqueadores do Receptor AT1 da Angiotensina. Contudo, esta hipótese parece pouco provável, pois os subgrupos genotípicos apresentavam frequência similar de uso destes anti-hipertensivos. Ademais, demonstramos em uma amostra de nossos pacientes (n=100; 62,5%), a ausência de diferenças significativas em marcadores de resistência à insulina, como a insulinemia e o índice HOMA-IR, entre os genótipos. Este achado sugere que a possível influência do polimorfismo -930A/G sobre os Triglicérides não é secundária à modulação da sensibilidade à insulina, mas sim a uma ação direta sobre o metabolismo desta fração lipídica.

Ao analisar todos os pacientes incluídos no estudo, encontramos uma diferença significativa entre os níveis de colesterol, os quais foram menores nos indivíduos com genótipo GG (p=0,04). Para evitar a influência de medicações que atuam especificamente na síntese de LDL-Colesterol, retiramos posteriormente da análise os indivíduos que estavam em uso de estatinas. Apesar de esta abordagem ter diminuído a nossa amostra (n=115), houve uma acentuação na diferença estatística entre os grupos estudados (p=0,01), dando mais consistência à idéia de que o polimorfismo -930A/G pode de correlacionar com níveis séricos de LDL-Colesterol.

Além das estatinas, aproximadamente 80% dos pacientes estavam em uso de diuréticos, os quais também podem influenciar os níveis de LDL-Colesterol. Contudo, a influência desta medicação em nossos resultados parece não ser significativa, pois sua frequência de utilização não variou entre os grupos genotípicos e praticamente todos os pacientes (95%) estavam em uso de uma mesma droga: Hidroclorotiazida 25mg ao dia.

Informações relevantes sobre o possível papel da NADPH-oxidase no metabolismo lipídico têm sido obtidas em modelos experimentais com perda de função de algumas de suas subunidades. Neste sentido, camundongos ApoE^{-/-}, os quais desenvolvem dislipidemia e aterosclerose, foram cruzados com animais knockout para a gp91-phox ou

p47-phox (KIRK *et al*, 2000; HSICH *et al*, 2000). Os animais ApoE^{-/-} p47phox^{-/-} apresentaram redução na produção de superóxido mas não desenvolveram alterações em seu perfil lipídico em comparação aos animais ApoE^{-/-} (HSICH *et al*, 2000). Por outro lado, os animais ApoE^{-/-} gp91phox^{-/-} não só apresentaram redução na produção de superóxido como também desenvolveram níveis sérico menores de Triglicérides e LDL-Colesterol em comparação aos ApoE^{-/-} (KIRK *et al*, 2000). Contudo, a análise de subfrações das lipoproteínas revelou que os animais ApoE^{-/-} gp91phox^{-/-} apresentavam modificações na distribuição relativa das lipoproteínas, com uma redução de 2 vezes nos níveis de HDL-Colesterol e um aumento de 60% nos níveis de LDL-Colesterol (especialmente de sua fração pequena e densa) em relação aos animais ApoE^{-/-} (KIRK *et al*, 2000), sugerindo que a NADPH oxidase pode atuar diretamente sobre o metabolismo das lipoproteínas, podendo contribuir para justificar os achados do presente estudo.

O mecanismo pelo qual o aumento no estresse oxidativo poderia atuar sobre o metabolismo lipídico permanece pouco conhecido, embora algumas evidências experimentais pareçam fornecer possíveis explicações. Estudos *in vitro* têm demonstrado que o aumento no stress oxidativo em fagócitos pode ser responsável por maior captações de lipoproteínas, em especial o LDL-Colesterol (DE KIMPE *et al*, 1998; TEISSIER *et al*, 2004). Este fenômeno parece ser secundário à expressão de *macrophage scavenger receptor* induzida pelos radicais livres de oxigênio e que aumentam a captação de lipoproteínas pelos macrófagos (DE KIMPE *et al*, 1998). Contudo, mais estudos fazem-se necessários para de determinar se esta maior captação de lipoproteínas induzida por stress oxidativo é capaz de reduzir os níveis séricos de LDL-colesterol ou Triglicérides.



6- CONCLUSÕES

Foi concluído no presente estudo que:

1. Não houve associação significativa entre a presença do polimorfismo -930A/G da p22phox e lesão renal ou alteração na estrutura de ventrículo esquerdo de pacientes hipertensos.
2. Houve associação significativa entre a presença do genótipo GG do polimorfismo -930A/G da p22phox e baixos níveis séricos de LDL-colesterol e triglicérides em hipertensos.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA R, NAGAI T, TANAKA M, ZOU Y, ISHIHARA T, TAKANO H, HASEGAWA H, AKAZAWA H, MIZUKAMI M, NAGAI R, KOMURO I. Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 289 : 901-907, 2001.

ARAÚJO DV, TAVARES LR, VERÍSSIMO R, FERRAZ MB, MESQUITA ET. Custo da Insuficiência cardíaca no Sistema Único de Saúde. *Arq Bras Cardiol.* 84: 422-427, 2005.

ARNETT DK. Genetic contributions to left ventricular hypertrophy. *Curr hypertens rep.* 2: 50-55, 2000.

BABIOR BM. NADPH Oxidase: An update. *Blood.* 5: 1464-1476, 1999.

BLOCH KD, GROSSMANN B, MOORE D, AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K. Restriction Endonucleases. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1: 3.1.1-3.1.9, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Dados de mortalidade de 2003. Brasília, 2005. [on line]. Disponível em: URL: <http://www.datasus.gov.br/principal.htm>. (Acesso em 15 de jul de 2006).

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Dados de morbidade de 2003. Brasília, 2004. [on line]. Disponível em: URL: <http://www.datasus.gov.br/principal.htm>. (Acesso em 15 de jul de 2006).

BRENNER BM. *Brenner & Rector's the kidney*. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2004. 2124–2125.

CAI H, GRIENDLING KK, HARRISON DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 24: 471-478, 2003.

CAHILLY C, BALLANTYNE CM, LIM DS, GOTTO A, MARIAN AJ. A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res.* 86(4):391-395, 2000.

CERIELLO A, GIUGLIANO D, QUATRARO A, LEFEBVRE PJ. Anti-oxidants show antihypertensive effect in diabetic and hypertensive subjects. *Clin Sci*. 81: 739–742, 1991.

CIFUENTES ME, PAGANO PJ. Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 15:179-186, 2006.

CHOBANIAN AV, HILL M. National Heart, Lung and Blood Institute Workshop on Sodium and Blood Pressure: A critical review of current scientific evidence. *Hypertension*. 35: 858-863, 2000.

CHU Y, IIDA S, LUND DD, WEISS RM, DIBONA GF, WATANABE Y, FARACI FM, HEISTAD DD. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ Res*. 92: 461–468, 2003.

DE KIMPE SJ, ANGGARD EE, CARRIER MJ. Reactive oxygen species regulate macrophage scavenger receptor type I, but not type II, in the human monocytic cell line THP-1. *Mol Pharmacol*. 53(6):1076-1082, 1998.

DE SIMONE G, DANIELS SR, DEVEREUX RB, MEYER RA, ROMAN MJ, DE DIVITIIS O, ALDERMAN MH. Left ventricular mass and body size in normotensive children and adults: assessment of allometric relations and impact of overweight. *J Am Coll Cardiol*. 20: 1251-1260, 1992.

DEVERAUX RB, REICHEK N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man: anatomic validation of the method. *Circulation*. 55: 613-618, 1977.

DEVERAUX RB, ROMAN MJ. Hypertensive cardiac hypertrophy: pathophysiologic and clinical characteristics. In: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. 2^a Edition. New York. Ed: Raven Press Ltd. 409-432, 1995.

DHALLA NS, TEMSAH RM, NETTICADAN T. Role of oxidative stress in cardiovascular disease. *J Hypertens*. 18: 655-673, 2000.

DÍEZ J, GONZALEZ A, LOPEZ B, RAVASSA S, FORTUÑO MA. Effects of antihypertensive agents on the left ventricle: clinical implications. *Am J Cardiovasc Drugs*. 1(4):263-79, 2001.

DUFFY SJ, GOKCE N, HOLBROOK M, HUANG A, FREI B, KEANEY JÚNIOR JF, VITA JA. Treatment of hypertension with ascorbic acid. *Lancet*. 354: 2048–2049, 1999.

FOGO A, BREYER JA, SMITH MC, CLEVELAND WH, AGODOA L, KIRK KA, GLASSOCK R. Accuracy of the diagnosis of hypertensive nephrosclerosis in African Americans: a report from the African Americans Study of Kidney Disease (AASK) Trial. AASK pilot study investigators. *Kidney Int*. 51:244-52, 1997.

FOGO AB. Mechanisms in nephrosclerosis and hypertension – beyond hemodynamics. *J Nephrol*. 14 (Suppl. 4):S63–S69, 2001.

FREEDMAN BI, SPRAY BJ, TUTTLE AB, BUCKALEW JÚNIOR VM. The familial risk of end-stage renal disease in African Americans. *Am J Kidney Dis*. 21: 387-393, 1993.

GRIENDLING KK, SORESCU D, USHIO-FUKAI M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research*. 86: 494-501, 2000.

GUZIK TJ, WEST NE, BLACK E, MCDONALD D, RATNATUNGA C, PILLAY R, CHANNON KM. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation*. 102(15):1744-7, 2000.

HAYAISHI-OKANO R, YAMASAKI Y, OHTOSHI K, YASUDA T, KATAKAMI N, HIRANO T, YOSHINO G, KAJIMOTO Y, HORI M. NAD(P)H oxidase p22 phox C242T polymorphism affects LDL particle size and insulin resistance in Japanese subjects. *J Atheroscler Thromb*. 9(4):200-205, 2002.

HEYMES C, BENDALL JK, RATAJCZAK P, CAVE AC, SAMUEL JL, HASENFUSS G, SHAH AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 41:2164-2171, 2003.

HSICH E, SEGAL BH, PAGANO PJ, REY FE, PAIGEN B, DELEONARDIS J, HOYT RF, HOLLAND SM, FINKEL T. Vascular effects following homozygous disruption of p47(phox) : An essential component of NADPH oxidase. *Circulation*. 101(11):1234-1236, 2000.

INNES BA, MCLAUGHLIN MG, KAPUSCINSKI MK, JACOB HJ, HARRAP SB. Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension. *Hypertension*. 31: 741-746, 1998.

ITO D, MURATA M, WATANABE K, YOSHIDA T, SAITO I, TANAHASHI N, FUKUUSHI N. C242T Polymorphism of NADPH Oxidase p22 *PHOX* Gene and Ischemic Cerebrovascular Disease in the Japanese Population. *Stroke*. 31: 936-939, 2000.

JOHNSON RJ, HERRERA-ACOSTA J, SCHREINER GF, RODRÍGUEZ-ITURBE B. Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *N Engl J Med*. 346:913–923, 2002.

JONES SA, HANCOCK JT, JONES OT, NEUBAUER A, TOPLEY N. The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox. *J Am Soc Nephrol*. 5:1483–1491, 1995.

KANNEL WB. Left ventricular hypertrophy as a risk factor in arterial hypertension. *European heart j*. 13: 82-88, 1992.

KAPLAN NM. Hypertension in the population at large. In: Kaplan NM. Kaplan's Clinical Hypertension 8. ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2002: 1-25.

KESTELOOT H, JOOSSENS JV. On the determinants of creatinine clearance: a population study. *J. Hum. Hypertens*. 10(4):245-249, 1996.

KIM MK, SASAKI S, OKUBO S, HAYASHI M, TSUGANE S. Lack of long-term effect of vitamin C supplementation on blood pressure. *Hypertension*. 40:797–803, 2002.

KIRK EA, DIANUER MC, ROSEN H, CHAIT A, HEINECKE JW, LEBOEUF RC. Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(6):1529-35, 2000.

KLAG M, WHELTON P, RANDALL BL, NEATON JD, BRANCATI FL, FORD CE, SHULMAN NB, STAMLER J. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med.* 334: 13-18, 1996.

KOKUBO Y, IWAI N, TAGO N, INAMOTO N, OKAYAMA A, YAMAWAKI H, NARABA H, TOMOIKE H. Association Analysis Between Hypertension and *CYBA*, *CLCNKB*, and *KCNMB1* Functional Polymorphisms in the Japanese Population. *Circ J.* 69: 138-142, 2005.

LASSEGUE B, CLEMPUS RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285: R277-297, 2003.

LEVY D, GARRISON RJ, SAVAGE DD, KANNEL WB, CASTELLI WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 322: 1561-1566, 1990.

LEVY D, LARSON MG, VASAN RS, KANNEL WB; HO KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA.* 275: 1557-1562, 1996.

LEWINGTON S, CLARKE R, QIZILBASH N, et al. – Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospectives studies. *Lancet.* 360: 1903-1913, 2002.

LORELL BH, CARABELLO BA. – Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection and prognosis. *Circulation.* 102: 470-479, 2000.

MANN JFE, GERSTEIN HC, POGUE J, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: The HOPE randomized trial. *Ann Intern Med* 134 (8): 629-36, 2001.

MANNING JÚNIOR RD, TIAN N, MENG S. Oxidative stress and antioxidant treatment in hypertension and the associated renal damage. *Am J Nephrol*. 25: 311-317, 2005.

MENG S, ROBERTS LJ, CASON GW, CURRY TS, MANNING JÚNIOR RD. Superoxide dismutase and oxidative stress in Dahl salt-sensitive and -resistant rats. *Am J Physiol*. 283:R732–R738, 2002.

MOELLER S, GIOBERGE S, BROWN G. ESRD patients in 2001: Global overview of patients, treatment modalities and development trends. *Nephrol Dial Transplant*. 17: 2071-2076, 2002.

MOHAZZAB KM, KAMINSKI PM, WOLIN MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*. 266: H2568-H2572, 1994.

MOORE D, AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K. Manipulation of DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*. 1: 2.1.1-2.1.3, 1998.

MORENO MU, SAN JOSÉ G, ORBE J, PÁRAMO JA, BELOQUI O, DÍEZ J, ZALBA G. Preliminary characterisation of the promoter of the human p 22^{phox} gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS Letters*. 542: 27-31, 2003.

MORENO MU, SAN JOSÉ G, FORTUÑO A, BELOQUI O, DÍEZ J, ZALBA G. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J Hypertens*. 24: 1299-1306, 2006.

NADRUZ JÚNIOR W, FRANCHINI KG. Influência de fatores ambientais e genéticos na hipertrofia e remodelamento cardíacos na hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 8: 414-424, 2001.

NADRUZ JÚNIOR W, LAGOSTA VJ, MORENO JR H, COELHO OR, FRANCHINI KG. Simvastatin prevents load-induced protein tyrosine nitration in overloaded hearts. *Hypertension*. 43: 1060-1066, 2004.

NEAL B., MACMAHON S, CHAPMAN N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: Results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood pressure lowering treatment trialists' collaboration. *Lancet*. 356: 1955-1964, 2000.

OGDEN LG, HE J, LYDICK E, WHELTON PK. Long-term absolute benefit of lowering blood pressure in hypertensive patients according to the JNC VI risk stratification. *Hypertension*. 35:539-43, 2000.

OLMOS RD, LOTUFO PA. Epidemiologia da hipertensão arterial no Brasil e no mundo. *Rev Bras Hipertens*. 9: 21-23, 2002.

PESSINA AC, CASIGLIA E, DAL PALU C. Aging, hypertension, and renal damage: generalities and results of the Cardiovascular Study in the Elderly. *Am J Kidney Dis*. 21:10-14, 1993.

RAVOGLI A, TRAZZI S, VILLANI A, MUTTI E, CUSPIDI C, SAMPIERI L, DE AMBROGGI L, PARATI G, ZANCHETTI A, MANCIA G. Early 24-hour blood pressure elevation in normotensive subjects with parental hypertension. *Hypertension*. 16: 491-497, 1990.

ROMÃO JÚNIOR JE, PINTO SWL, CANZIANI ME, PRAXEDES JN, SANTELLO JL, MOREIRA JCM. Censo SBN 2002: Informações epidemiológicas das unidades de diálise do Brasil. *J Bras Nefrol*. 25: 188-199, 2003.

ROMÃO JÚNIOR JE. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J Bras Nefrol*. 26: 1-3, 2004.

ROSARIO RF, WESSON DE. Primary hypertension and nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 15:130-134, 2006

RUSSO C, OLIVIERI O, GIRELLI D, FACCINI G, ZENARI ML, LOMBARDI S, CORROCHER R. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 16: 1267-1271, 1998.

SAHN DJ, DEMARIA A, KISSLO J, WEYMAN A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 58: 1072-1083, 1978.

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIN N. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354, 1985.

SAN JOSÉ G, MORENO MU, OLIVÁN S, BELOQUI O, FORTUÑO A, DÍEZ J, ZALBA G. Functional effect of the p22^{phox}-930^{A/G} polymorphism on p22^{phox} expression and NADPH oxidase activity in hypertension. *Hypertension*. 44: 163-169, 2004.

SAWYER DB, SIWIK DA, XIAO L, PIMENTEL DR, SINGH K, COLUCCI WS. Role of oxidative stress in miocardial hypertrophy and failure. *L mol cell cardiol*. 34: 379-388, 2002.

SCHÄCHINGER V, BRITTEN MB, DIMMELER S, ZEIHNER AM. NADH/NADPH oxidase p22phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *Eur Heart Jour*. 22: 96-101, 2001.

SOUZA HP, LAURINDO FR, ZIEGELSTEIN RC, BERLOWITZ CO, ZWEIER JL. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb;280(2):H658-667, 2001.

STEWART S, JENKINS A, BUCHAN S. The current cost of heart failure to the National Health Service in the UK. *The European Journal of Heart Failure*. 4: 373-376, 2002.

SHIMO-NAKANISHI Y, HASEBE T, SUZUKI A, MOCHIZUKI H, NOMIYAMA T, TANAKA D, NAGAOKA I, MIZUNO Y, URABE T. Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction. *Atherosclerosis*. 175(1):109-115, 2004.

SIWIK DA, TZORTZIS JD, PIMENTAL DR. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res*. 85:147-153, 1999.

TEISSIER E, NOHARA A, CHONETTI G, PAUMELLE R, CARIOU B, FRUCHART JC, BRANDES R, SHAH A, STAELS B. Peroxisome proliferator-activated receptor induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-activation properties. *Circ Res.* 95: 1174–1182, 2004.

TIAN N, THRASHER KD, GUNDY PD, HUGHSON MD, MANNING JUNIOR RD. Antioxidant treatment prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension. *Hypertension.* 45: 934–939, 2005.

TROLLIET MR, RUDD MA, LOSCALZO J. Oxidative stress and renal dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Res.* 24: 116–123, 2001.

V DIRETRIZES Brasileiras de Hipertensão Arterial – Sociedade Brasileira de Cardiologia Sociedade Brasileira de Hipertensão e Sociedade Brasileira de Nefrologia – Disponível em: http://www.diabetes.org.br/educacao/documentos/documents/V_DBHA_2006.pdf (acesso em 24 de Jul de 2006).

VAKILI BA, OKIN PM, DEVEREUX RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J.* 141: 334-341, 2001.

VASAN RS, LARSON MG, LEIP ET. Assessment of frequency of progression to hypertension in nonhypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet.* 358: 1682-1686, 2001.

VAZIRI ND, LIANG K, DING Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int.* 56: 1492–1498, 1999.

VAZIRI ND, WANG XQ, OVEISI F, RAD B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension.* 36: 142–146, 2000.

VOYTAS D, MOORE D, AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K. Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1: 2.5A.1-2.5A.9, 1998.

ZALBA G, SAN JOSÉ G, BEAUMONT FJ, FORTUÑO MA, FORTUÑO A, DÍEZ J. Polymorphisms and promoter overactivity of the p22phox gene in vascular smooth muscle cells from SHR. *Circ Res.* 88: 217-222, 2001.

ZOU AP, LI N, COWLEY JÚNIOR AW. Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension.* 37: 547–553, 2001.



8- ANEXOS

Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido para Pesquisa Médica

Título do projeto: Avaliação dos polimorfismos gênicos da NADPH-oxidase em pacientes hipertensos e familiares.

Objetivo da pesquisa

Eu entendo que fui convidado a participar de uma pesquisa envolvendo pessoas com hipertensão arterial (pressão alta) e que podem ter ou não hipertrofia ventricular esquerda (aumento da espessura das paredes do coração), que tem como objetivo estudar se o fato de a hipertrofia ventricular esquerda em pacientes hipertensos ser determinado geneticamente.

Procedimento

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, terei uma amostra de sangue colhida em jejum (20 ml, mais ou menos 2 seringas). Este sangue será utilizado para pesquisa de genes e para dosagens do nível de açúcar e colesterol.

Sei que o médico pesquisador fará perguntas sobre meus problemas de saúde, e consultará meu prontuário médico. Ele irá medir meu peso e altura. Não haverá nenhuma alteração nos meus medicamentos.

Risco e desconforto

Estou ciente de que o risco associado à coleta de sangue será mínimo, pois se trata de um exame de sangue tradicional, que será realizado na veia do braço por um profissional treinado e habilitado.

Sigilo e confidencialidade

Sei que haverá sigilo sobre todos os dados coletados, mantido através da utilização de códigos numéricos para identificação dos participantes.

Vantagens

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação neste estudo, e que apenas receberei o resultado dos exames realizados rotineiramente no serviço, como dosagens de açúcar e colesterol no sangue, eletrocardiograma e ecocardiograma.

Qualquer dúvida ou informação poderei contactar o Dr. Wilson Nadruz Junior ou a Dra. Maria Lilian Sales pelo telefone: 19-3788-8951

Informação sobre resultado da pesquisa

A qualquer momento poderei questionar sobre os resultados da pesquisa e do estudo genético realizado com meu sangue caso seja do meu interesse.

Fornecimento de informação adicional

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações poderei contatar o Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, tel (19) 3788-8936.

Recusa ou descontinuação da participação

Eu entendo que a minha participação é voluntária; que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento; e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento, sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro.

Armazenamento de material biológico

Do sangue coletado extrai-se o DNA para a realização de estudo genético, este DNA pode ser armazenado para uso no estudo atual e em estudos futuros.

() Autorizo o armazenamento do meu DNA para estudos

() Não autorizo o armazenamento do meu DNA para estudos

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____ explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos e desconforto advindos dessa pesquisa. Eu li e/ou recebi explicação, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de acordo em participar desse estudo.

Nome e RG do participante

Assinatura do participante ou responsável

Data

Responsabilidade do pesquisador:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável. Ademais, comprometo-me a submeter à aprovação pelo Comitê de ética da FCM-UNICAMP qualquer novo estudo que se utilize de informações referentes ao presente estudo.

Nome e RG da pesquisador

Assinatura da pesquisador

Data

Interactions of p22-phox -930A/G Polymorphism with End-Organ Damage and Metabolic Profile in Hypertensive Patients

Maria L. Sales*, Maria C. S. Ferreira[#], Cid A. Leme Jr*, Lício A. Velloso*, Maria C. J. Gallani[#], Roberta C. R. Colombo[#], Kleber G. Franchini*, Wilson Nadruz Jr*.

*** Department of Internal Medicine, School of Medicine, State University of Campinas.**

[#] School of Nursing, State University of Campinas.

Address for correspondence:

Wilson Nadruz Junior, MD, Ph.D.

Departamento de Clínica Médica

Faculdade de Ciências Médicas,

Universidade Estadual de Campinas

Cidade Universitária “Zefferino Vaz”

13081-970 Campinas, SP. Brasil.

Phone: (55) (19) 3788 7836

FAX: (55) (19) 3788 7836

E-Mail: wilnj@fcm.unicamp.br

Running Head: p22-phox -930A/G variant in hypertensive end-organ damage

Keywords: hypertension; p22-phox; cardiac hypertrophy; polymorphism; NAD(P)H-oxidase

The p22-phox subunit is an essential component of the NAD(P)H oxidase enzymatic complex, which is considered the major source of oxidative stress products in the cardiovascular system (1, 2). The -930G allele of *p22-phox* has been associated with higher promoter activity, increased NAD(P)H oxidase-mediated oxidative stress and hypertension (3, 4). We recently reported that left ventricular hypertrophy is accompanied by increased myocardial p22-phox expression in aortic-banded rats, suggesting that this protein might be involved in hypertensive cardiac hypertrophy (2). Thus, the aim of the present report was to investigate the role of p22-phox -930A/G polymorphism on end-organ damage in hypertensive patients.

The study was carried out in 144 hypertensive patients (54 men, mean age 57±1 years), followed up at the Hypertension Unit of State University of Campinas between January 2005 and June 2006. Clinical data were based on medical history, physical examination, and routine analytical tests. Echocardiographic evaluation was performed as previously described (5). Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes, amplified by polymerase chain reaction and polymorphisms were detected by restriction reaction (3). The study was approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas, and informed consent was obtained from all participants. Data are expressed as means±SE. The statistical significance of differences was analyzed by Mann-Whitney *U* test. Comparisons between categoric variables were made by χ^2 test.

Table 1 shows clinical, laboratorial and echocardiographic features of the enrolled subjects. The p22-phox -930A/G polymorphism distribution was in accordance to the Hardy-Weinberg equilibrium (AA=29, AG=58, GG=57). Given the described functional effect of GG in comparison to AA and AG genotypes (3, 4), AA subjects were added to AG ones. There were no differences regarding gender, age, diabetes mellitus, smoking, blood pressure, body mass index, abdominal circumference, glucose, C-Reactive Protein as well as total, LDL and HDL cholesterol levels between the studied groups. However, triglyceride levels were significantly lower in GG in comparison to AA/AG subjects.

Values of plasmatic creatinine, creatinine clearance and albuminuria were similar between the genotype groups. Left ventricular structural parameters assessed by echocardiography were not different between AA and AA/AG hypertensives. Ninety one percent of the patients were taking antihypertensive medications, while 26% and 1% were using statins and fibrates, respectively. Nevertheless, there were no statistical differences in the frequency of these medications between the two subgroups.

Previous observations demonstrated that p22-phox -930GG genotype is associated with increased leukocyte-derived superoxide production in hypertensives but not in normotensives (4), indicating that tissues harboring this genotype could be exposed to higher oxidative stress under conditions of pressure overload. Since oxidative stress is implicated in the pathogenesis of hypertensive end-organ damage (1, 2) and p22-phox is expressed in human vascular, cardiac and renal tissues (1, 6, 7) we investigated here whether this putative pro-oxidant variant might affect cardiac and renal injury mediate by hypertension. In contrast to our hypothesis, the present results showed that the p22-phox -930A/G polymorphism does not affect left ventricular mass or geometric pattern and renal function or albuminuria in hypertensive patients. Nevertheless, genetic variants involved in oxidative stress pathways may still play a substantial part in the determination of the deleterious effects of hypertension, regardless of the failure of the present study to show a significant role for the -930A/G polymorphism. In this context, mutation scanning of more candidate genes in the NAD(P)H-oxidase system is likely to expand our knowledge of the role of genetic factors in hypertensive end-organ damage.

Our results showing lower triglyceride levels in GG subjects were somewhat surprising since carriage of this genotype has been correlated with increased oxidative stress (4), which is a risk factor for the development of insulin resistance and hence, hypertriglyceridemia (8). One explanation might be the fact that most of the subjects enrolled in the study were taking antihypertensive drugs, possibly affecting their metabolic profile. However, this hypothesis turns less probable since the genotype subgroups showed no significant differences in the frequency of medications potentially interfering in insulin sensitivity and triglyceride levels such as Diuretics, Beta-Blockers, ACE inhibitors, and Angiotensin-Receptor Blockers. Another possibility may reside in the fact that -930A/G

polymorphism is in linkage disequilibrium with another functional polymorphism. Moreover, it cannot be discarded that -930A/G variant indeed affects triglyceride metabolism in hypertensive patients, perhaps by modulating insulin sensitivity. This would raise the possibility that, although increasing the risk of hypertension (3), carriage of GG genotype is associated with a better metabolic profile in hypertensives.

In conclusion, our results provide no support to the hypothesis that p22-phox -930A/G polymorphism is involved in end-organ damage induced by hypertension. Further studies are necessary to confirm whether this variant plays a role in insulin sensitivity in hypertensive patients.

1. Cifuentes ME, Pagano PJ. Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:179-186.
2. Nadruz W Jr, Lagosta VJ, Moreno H Jr, Coelho OR, Franchini KG. Simvastatin prevents load-induced protein tyrosine nitration in overloaded hearts. *Hypertension* 2004;43:1060-1066.
3. Moreno MU, San Jose G, Orbe J, Paramo JA, Beloqui O, Díez J et al. Preliminary characterisation of the promoter of the human p22phox gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS Lett.* 2003;542:27–31.
4. San Jose G, Moreno MU, Olivan S, Beloqui O, Fortuno A, Diez J, et al. Functional effect of the p22phox -930A/G polymorphism on p22phox expression and NADPH oxidase activity in hypertension. *Hypertension* 2004;44:163-169.
5. Borges MC, Colombo RC, Goncalves JG, Ferreira JO, Franchini KG. Longitudinal mitral annulus velocities are reduced in hypertensive subjects with or without left ventricle hypertrophy. *Hypertension* 2006;47:854-860.
6. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2164-2171.
7. Jones SA, Hancock JT, Jones OT, Neubauer A, Topley N. The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1483–1491.
8. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1553-1567.

What is known on this topic

- Oxidative stress is implicated in the pathogenesis of hypertension and related end-organ damage. The p22-phox subunit is an essential component of the NAD(P)H oxidase enzymatic complex, which is considered the major source of oxidative stress products in the cardiovascular system.
- The -930G allele of *p22-phox* has been associated with increased NAD(P)H oxidase-mediated oxidative stress and hypertension.

What this study adds

- There seems to be no association between p22-phox -930A/G polymorphism and hypertensive cardiac/renal damage.
- Carriage of p22-phox -930GG genotype is associated with lower triglyceride levels in

hypertensives.

Table 1- Characteristics of hypertensive subjects classified according to the -930A/G polymorphism

Parameter	AA/AG N= 87	GG N= 57	<i>P</i>
Clinical			
Gender, male/female	32/55	22/35	NS
Age, years	58±2	56±1	NS
Diabetes Mellitus, n(%)	12(13)	10(17)	NS
Smoking, n(%)	14(16)	7(12)	NS
Systolic blood pressure, mmHg	145±3	142±2	NS
Diastolic blood pressure, mmHg	89±1	89±1	NS
Pulse pressure, mmHg	56±2	53±2	NS
Body mass index, kg/m ²	30±1	30±1	NS
Abdominal Circumference, cm	102±1	101±2	NS
Glucose, mg/dL	101±2	100±4	NS
Total cholesterol, mg/dL	199±4	188±6	NS
HDL-cholesterol, mg/dL	52±1	52±1	NS
LDL-cholesterol, mg/dL	123±4	112±5	NS
Triglycerides, mg/dL	157±10	123±9	<0.05
C-Reactive Protein, mg/dL	0.72±0.1	0.59±0.1	NS
Creatinine, mg/dL	1±0.02	1±0.06	NS
Creatinine Clearance, mL/min	85±3	85±4	NS
Urinary Albumin/Creatinine Ratio, mg/g	98±33	80±33	NS
Echocardiographic			
Left ventricular mass, g	275±10	264±13	NS
Left ventricular mass index, g/m ^{2.7}	77±3	75±3	NS
Septal thickness, mm	11.1±0.2	10.8±0.2	NS
Posterior wall thickness, mm	11.3±0.2	11±0.2	NS
Relative wall thickness (RWT)	0.45±0.01	0.43±0.01	NS
Medications			
Antihypertensives, n(%)	80(92)	52(91)	NS
Diuretics	72(82)	41(72)	NS
ACE inhibitors/ Angiotensin Receptor Blocker	63(72)	40(70)	NS
Beta-Adrenergic Blocker	50(57)	20(35)	NS
Calcium-Channel Blocker	34(39)	22(38)	NS
Alpha-Adrenergic Blocker	10(11)	5(9)	NS
Arterial Vasodilators	4(4)	4(7)	NS
Statins, n(%)	26(30)	12(19)	NS
Fibrates, n(%)	2(2)	0(0)	NS