

JUAN CARLOS YUGAR TOLEDO

HIPERTENSÃO ARTERIAL REFRACTÁRIA:

caracterização fenotípica,
avaliação cardiovascular morfo-funcional e correlação
com polimorfismos genéticos do sistema renina -
angiotensina e da sintase endotelial do óxido nítrico

CAMPINAS

2006

JUAN CARLOS YUGAR TOLEDO

HIPERTENSÃO ARTERIAL REFRACTÁRIA:

caracterização fenotípica,
avaliação cardiovascular morfo-funcional e correlação
com polimorfismos genéticos do sistema renina -
angiotensina e da sintase endotelial do óxido nítrico

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia*

Orientador: Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

CAMPINAS

2006

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

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

T575h	Toledo, Juan Carlos Yugar Hipertensão arterial refratária: caracterização fenotípica, avaliação cardiovascular morfo-funcional e correlação com polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina e da sintase endotelial do óxido nítrico / Juan Carlos Yugar Toledo. Campinas, SP: [s.n.], 2006. Orientador: Heitor Moreno Júnior Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1- Hipertensão. 2- Sistema renina-angiotensina. 3- Pressão Arterial. 4- Remodelação Ventricular. I- Moreno Júnior, Heitor. II- Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III- Título.
-------	--

Título em inglês: “Refractory hypertension: phenotypic characterization, cardiovascular morpho-functional assessment and correlation with the renin-angiotensin-aldosterone and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms”

Keywords: • Hypertension
• Renin-Angiotensin System
• Blood Pressure
• Ventricular Remodeling

Titulação: Doutorado em Farmacologia

Banca examinadora: Prof Dr Heitor Moreno Júnior
Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen
Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza
Prof Dr Kleber Gomes Franchini
Prof Dr Domingo Marcolino Braille

Data da defesa: 12-07-2006

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Membros:

Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen

Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

Prof. Dr. Kleber G Franchini

Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile

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

Data: 12/07/2006

*Aos meus pais,
Dr. Juan Alejandro Yugar Lopez e Dra. Aida Toledo Guzmán Yugar,
pelo legado moral, ético, profissional, humanitário e social.*

À sábia natureza, que iluminou meu caminho, minha vida, que guiou meus pensamentos fortalecendo minha alma, sustentando meus ideais e me ajudou a vencer as adversidades.

À minha esposa Lúcia Helena, que com enorme coragem e destemida força de vontade, não poupou sacrifícios para permitir que o meu sonho se tornasse realidade, dando-me apoio incondicional na árdua tarefa de completar este ciclo.

Às minhas filhas Vivian, Lara e Louise, que na tenra infância compreenderam a importância desta jornada e participaram dando-me incentivo e o brilho aprovador dos seus olhos.

À minha querida irmã Lívia que mais uma vez, esteve presente em todos os momentos, dando-me o maior apoio logístico e cobrindo as minhas ausências do nosso serviço.

À minha avó Antonia, eternamente lembrada pela inabalável fé e confiança em mim depositada durante os poucos anos de convívio em sua companhia, que marcaram para sempre por sua contagiante força de vencer desafios sem desistir jamais.

Às minhas irmãs Tânia, Lina e Mila e ao meu irmão Ivan por todo o carinho, ajuda e apoio recebidos.

À Leoní Adriana Souza, minha companheira de doutorado, pelo inestimável auxílio no cuidado dos pacientes e voluntários do ambulatório, pelo extremo profissionalismo na execução dos exames e pelo extraordinário apoio e carinho nos momentos mais críticos da elaboração deste trabalho.

À Samira Ubaud Girioli, minha colega de profissão e companheira de doutorado, pelo inestimável auxílio no cuidado dos pacientes e voluntários do ambulatório e a excepcional ajuda na realização dos exames.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia Elaine de Sousa Ferreira Carvalho de Melo, minha colega de Mestrado e Doutorado, pelo incansável ajuda, esclarecimentos pertinentes e auxílio ímpar no uso de programas de cálculos estatísticos, formatação, elaboração de bibliotecas virtuais, desenhos gráficos e execução final deste trabalho.

Às minhas colegas de pós-graduação Walnéia de Souza, Letícia Bignoni e Patrícia Panunto, pela força, incentivo e pronta colaboração sempre que precisei.

Ao meu querido amigo Joaquim Francisco do Prado, que participou desde o início e bem próximo no dia a dia da execução desta longa jornada, com a maior atenção e dedicação plena em todas as etapas deste trabalho, compartilhando as dificuldades, resolvendo problemas, e como sempre, bem disposto.

Ao Adilson Thomaz, que esteve sempre próximo ajudando em várias etapas da elaboração deste trabalho.

À Dra. Glória F. A. Mota, do Incor-USP, pela extraordinário colaboração na realização dos estudos genéticos.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus Santos, cientista amigo e colaborador de várias etapas deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Valéria Sandrim, pela competente colaboração durante a execução final deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, por todo auxílio, apoio e inestimável colaboração.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pelos sábios ensinamentos recebidos e serena colaboração.

Ao Prof. Dr. Otávio Rizzi, pelo apoio e auxílio na execução deste projeto.

Ao Sr. Wanderlei, pela tolerância, amabilidade e presteza no auxílio da execução das diferentes etapas que compõem esta longa tarefa.

Aos meus cunhados Luis César Bonalume Tácito e Maria Olívia Malagoli Santos, que não pouparam sacrifícios para que esta etapa seja superada, minha eterna gratidão pelo apoio recebido e por terem cuidado de mim, como verdadeiros irmãos.

À bióloga mestranda em Biologia Molecular Srta. Marcela Pinhel, pela excelente colaboração na execução dos testes de pesquisa genética.

Aos acadêmicos Marcelo Nakasone e Anielli Pinheiro, pela contribuição na execução dos testes de pesquisa genética.

Aos professores e funcionários do departamento de Farmacologia da UNICAMP.

Aos pacientes e voluntários que participaram deste projeto.

À FAPESP, CAPES, FAEP e CNPq pelo auxílio e apoio científico.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Heitor Moreno Jr**, pelo fraterno incentivo, cooperação, compreensão, tolerância e excepcional orientação na execução deste trabalho. Pelo longínquo convívio profissional e humano, pelo incondicional apoio e confiança em mim depositada desde o momento em que aceitou ser meu orientador. E, principalmente, por permitir completar o principal objetivo da minha escolha profissional: a **pesquisa** como fonte de vida e inspiração.

Ao **Prof. Dr. José Eduardo Krieger**, pelo apoio, incentivo, excepcional auxílio na execução dos estudos genéticos, e orientação precisa e incontestável na execução de todas as etapas deste projeto.

Ao **Prof. Dr. Alexandre C. Pereira**, pela excelente colaboração na realização dos estudos genéticos e a inestimável ajuda na elaboração deste trabalho.

À **Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen**, pelo carinho, incentivo e auxílio competente e sereno.

Ao **Prof. Dr. José Fernando Vilela Martin**, excepcional médico, pesquisador e professor universitário, pelo enorme incentivo conferido durante a execução deste trabalho e principalmente pelo apoio amigo recebido.

À **Prof. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza**, grande incentivadora de pesquisa científica aplicada à clínica, que me ajudou de maneira incondicional.

*O fascínio na aventura de perseguir a verdade,
é na pesquisa,
uma sedução excitante.*

Irany Novah Moraes.

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xlvi</i>
ABSTRACT.....	<i>li</i>
INTRODUÇÃO.....	55
1- Considerações gerais.....	57
2- Conceituação, prevalência e diagnóstico e hipertensão arterial.....	57
2.1- Fatores associados de elevação da PA.....	59
2.2- Hipertensão arterial refratária.....	62
2.2.1- Adesão ao tratamento.....	63
2.2.2- Hipertensão refratária associada à prescrição inadequada de fármacos anti-hipertensivos.....	64
2.2.3- Interações com drogas.....	65
2.2.4- Condições associadas.....	66
2.2.5- A importância da sobrecarga volêmica.....	68
2.2.6- Hipertensão arterial secundária.....	69
3- Aspectos genéticos da hipertensão arterial.....	70
4- Endotélio.....	73
5- Óxido nítrico.....	74
6- Sistema renina - angiotensina - aldosterona.....	83
6.1- Angiotensinogênio.....	85
6.2- Enzima conversora da angiotensina I.....	87

7- Vasodilatação mediada pelo fluxo.....	90
8- Disfunção endotelial.....	91
9- Avaliação da massa de ventrículo esquerdo.....	92
10- Avaliação da espessura íntima - média das carótidas.....	93
11- Hipótese.....	94
OBJETIVOS.....	95
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	99
1- CASUÍSTICA.....	101
1.1- Características dos pacientes.....	101
1.2- Seleção e acompanhamento clínico.....	101
1.2.1- Critérios de inclusão.....	102
1.2.2- Critérios de exclusão.....	102
2- MÉTODOS.....	103
2.1- Coleta de dados clínicos.....	103
2.2- Medida da pressão arterial.....	103
2.3- Estudo de adesão.....	104
2.3.1- Determinação da adesão ao tratamento pelo método de contagem de comprimidos.....	104
2.4- Avaliação laboratorial.....	105
2.5- Eletrocardiograma e ecocardiograma.....	106
2.6- Avaliação da espessura íntima - média das carótidas.....	106
2.7- Avaliação funcional do endotélio vascular.....	108
2.7.1- Vasodilatação mediada pelo fluxo (VMF).....	108

2.8- Avaliação dos polimorfismos genéticos.....	112
2.8.1- Extração de DNA de leucócitos de sangue periférico.....	112
2.8.2- Análise do polimorfismo Glu298Asp do gene da eNOS.....	113
2.8.3- Análise do polimorfismo Inserção/Deleção da enzima conversora da angiotensina.....	114
2.8.4- Análise do polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio....	116
3- ESTATÍSTICA.....	118
3.1- Análise descritiva.....	118
3.2- Análise inferencial.....	119
RESULTADOS.....	121
1- Dados demográficos antropométricos e clínicos.....	123
2- Monitorização da pressão arterial (MAPA).....	124
3- Perfil bioquímico.....	125
4- Avaliação da massa do ventrículo esquerdo.....	127
5- Avaliação da espessura íntima - média das carótidas.....	128
6- Avaliação da reatividade vascular.....	129
6.1- Variação percentual do diâmetro da artéria braquial (vasodilatação mediada pelo fluxo - VMF).....	129
6.2- Variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo farmacológico (nitroglicerina sublingual).....	130
7- Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Glu-Asp do gene da sintase endotelial do óxido nítrico.....	132
8- Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo inserção/deleção do gene da enzima conversora da angiotensina.....	134

9- Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio.....	136
10- Correlação dos polimorfismos dos sistemas renina - angiotensina - aldosterona e óxido nítrico com alterações morfológicas e funcionais cardiovasculares.....	139
DISCUSSÃO.....	141
CONCLUSÕES.....	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157
ANEXOS.....	197

5'AMP	5'adenosina monofosfato
5'GMP	5'guanosina monofosfato
°C	Graus célsio
A	Adenina
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACTH	Adrenocortic tropic hormone
ADP	Adenosina – fosfato
AG	Angiotensina
AGT	Angiotensinogênio
Akt	Proteína quinase b
AMPc	3',5'adenosina monofosfato cíclico
ANP	Peptídeo Atrial Natriurético
ARP	Atividade plasmática de renina
AT	Receptor de angiotensina
AT₁	Receptor de angiotensina tipo 1
AT1A	Receptor de angiotensina tipo 1 A
AT1B	Receptor de angiotensina tipo 1 B
AT₂	Receptor de angiotensina tipo 2
ATP	Adenosina tri-fosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BH4	Tetra-hidro-biopterina
bp	Base pair

C	Citosina
CA	Coeficiente de adesão
Ca⁺⁺	Cálcio
Ca⁺²/CaM	Complexo cálcio/calmodulina
CaM	Calmodulina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CE	Célula endotelial
cm	Centímetro
CMLV	Célula do músculo liso vascular
cNOS	Sintase constitutiva do óxido nítrico
CPA	Concentração plasmática de aldosterona
C-T	Citosina – timina
CT	Colesterol total
CV	Cardiovascular
D	Alelo deleção
DAC	Doença arterial coronariana
DC	Débito cardíaco
DCV	Doença cardiovascular
DD	Genótipo deleção/deleção
DDVE	Diâmetro diastólico de ventrículo esquerdo
DE	Disfunção endotelial
DP	Desvio padrão da média
DNA	Ácido desoxirribonucléico

dNTP	Nucleotídeo d
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
ECTIM	Estudo caso-controle de infarto do miocárdio
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDTA	Ácido etil-enediamino-tetra-acético
EIM	Espessura íntima – média
EUA	Estados Unidos de América
eNOS	Sintase endotelial do óxido nítrico
F	Feminino
FAD	Dinucleotídeo de flavina
FC	Frequência cardíaca
Fe⁺²	Ferro
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FMN	Mononucleotídeo de flavina
g	Gramma (unidade de medida de peso)
G	Guanina
GC	Guanilato ciclase
GC_p	Guanilato ciclase particulada
GC_s	Guanilato ciclase solúvel
GDP	Guanosina bi-fosfato
gECA	Enzima conversora de angiotensina germinativa
GMP	Guanosina mono-fosfato

GMPC	guanosina-3',5'-monofosfato cíclica
GTP	Guanosina tri-fostato
h	Hora
HA	Hipertensão arterial
HAR	Hipertensão arterial refratária
HB	Hidrobiopterina
HDLc	Colesterol de lipoproteína de alta densidade
HT	Hipertensão controlada
I	Alelo inserção
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
I/D	Polimorfismo inserção/deleção
IFNγ	Interferon gama
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Sintase induzível do óxido nítrico
IV	Quarto
JNC	Joint National Committe
KB	Quilobases
Km	Concentração média
Kg	Quilograma
L	Levo
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLc	Colesterol de lipoproteína de baixa densidade

L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina-metil-éster
M	Alelo metionina
m	Metro
MAPA	Monitorização ambulatorial da pressão arterial
MIBG	Meta-iodo-benzil-guanidina
MC	Membrana celular
mg	Miligrama (unidade de medida de peso)
MHZ	Megahertz
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro(unidade de medida de volume)
min	Minuto
mmHg	Milímetro de mercúrio
mM	Milimolar
MM	Genótipo metionina-metionina
MT	Genótipo metionina-treonina
MVE	Massa de ventrículo esquerdo
N⁽¹⁾	Radical nitro
Nº	Número
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio
NF-kB	Fator de necrose kappa beta
ng	Nanograma
nNOS	Enzima óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico

NO-GMP	Óxido nítrico – guanosina monofosfato
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NTG	Nitroglicerina
O₂	Oxigênio
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PC	Peso corporal
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PK	Proteína quinase
PKA	Proteína quinase ativada por AMPc
PKG	Proteína quinase ativada por GMPc
PNA	Peptídeo natriurético atrial
PP	Pressão de pulso
PPVED	Parede posterior de ventrículo esquerdo em diástole
pw	Onda pulsada
R	Renina
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAs	Ácidos ribonucleicos
rpt	Polimorfismo na região de translação
SBH	Sociedade Brasileira de Hipertensão
SC	Superfície corporal

sECA	Enzima conversora de angiotensina forma longa
Ser	Serina
SNC	Sistema nervoso central
SIVD	Septo interventricular em diástole
SNP	Polimorfismo de base única
SNPs	Polimorfismos de base única
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
T	Alelo treonina
TAE	Tampão (Tris-ácido acético-EDTA)
TG	Triglicérides
TGFB	Fator transformador de crescimento beta
Thr	Treonina
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
TT	Genótipo treonina-treonina
U-S	Ultra-som
V	Volume
VE	Ventrículo esquerdo
VGF	Fator de crescimento vascular
VGEF	Fator de crescimento vascular derivado do endotélio
VMF	Vasodilatação medida pelo fluxo
V-NTG	Vasodilatação nitroglicerina mediada
VNTR	Número variável de repetições em sequência
ZN⁺²	Zinco

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Características demográficas, antropométricas e clínicas dos três grupos estudados.....	123
Tabela 2 Resultados da monitorização ambulatorial da PA (MAPA) nos três grupos.....	124
Tabela 3 Valores bioquímicos dos três grupos estudados.....	126
Tabela 4 Valores absolutos (mm) da variação do diâmetro da artéria braquial em resposta a estímulo mecânico (vasodilatação mediada pelo fluxo-VMF) e estímulo farmacológico (vasodilatação nitroglicerina induzida) nos três grupos em estudo.....	129
Tabela 5 Associação dos polimorfismos genéticos do SRAA e da eNOS e alterações morfológicas e funcionais cardiovasculares.....	140

	Pág.
Figura 1 Interação entre fatores de risco cardiovascular e hipertensão arterial.....	60
Figura 2 Interação entre fatores genéticos e ambientais e sua relação com a PA.....	61
Figura 3 Reação de síntese de óxido nítrico (NO) basal.....	76
Figura 4 Mecanismo de sinalização NO/GMPc no sistema vascular ambientais.....	78
Figura 5 Esquema representativo do gene da eNOS.....	81
Figura 6 Esquema representativo do gene do angiotensinogênio.....	86
Figura 7 Esquema representativo do gene da enzima conversora da angiotensina.....	88
Figura 8 Esquema representativo do método de avaliação da espessura íntima - média.....	108
Figura 9 Protocolo de avaliação da Vasodilatação Mediada pelo Fluxo.....	111
Figura 10 Técnica de mensuração da reatividade vascular da artéria braquial.....	112
Figura 11 Eletroforese em gel de agarose a 12% do polimorfismo Glu-Asp da eNOS.....	114
Figura 12 Eletroforese em gel de agarose a 1,8% do polimorfismo I/D da ECA.....	116
Figura 13 Eletroforese em gel de agarose a 2,5% do polimorfismo M235T do AGT.....	118
Figura 14 Resultados da avaliação da massa do ventrículo esquerdo.....	127

Figura 15	Resultados da avaliação da espessura íntima-média das (EIM) carótidas.....	128
Figura 16	Variação percentual (%) do diâmetro da artéria braquial VMF.....	130
Figura 17	Variação percentual (%) do diâmetro da artéria braquial NTG.....	131
Figura 18	Distribuição de frequências alélicas para o polimorfismo Glu-Asp da eNOS.....	133
Figura 19	Distribuição dos genótipos para o polimorfismo Glu-Asp da eNOS.....	134
Figura 20	Distribuição de frequência alélicas para o polimorfismo I/D da ECA.....	135
Figura 21	Distribuição dos genótipos para o polimorfismo I/D da ECA.....	136
Figura 22	Distribuição de frequências alélicas para o polimorfismo M35T do gene do angiotensinogênio.....	137
Figura 23	Distribuição dos genótipos para o polimorfismo M35T do gene do angiotensinogênio.....	138

Capa resumo

A Hipertensão arterial refratária (HAR) é definida, de acordo com o *Seventh Joint National Committee* (JNC VII), quando os níveis pressóricos permanecem acima de 140 mm Hg para pressão arterial sistólica e 90 mm Hg para pressão arterial diastólica, mesmo sob uso de três ou mais classes de anti-hipertensivos, incluindo um diurético em dose plena e os demais anti-hipertensivos em doses submáximas a despeito de boa adesão ao tratamento não-farmacológico e farmacológico.

A fisiopatologia da hipertensão arterial, inclusive a refratária, é complexa, sendo modulada por diversos fatores interligados: sistema nervoso autônomo, músculo liso vascular (endotélio-óxido nítrico) e rins, além do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), entre outros. Desta forma, a fisiopatologia da HA é assumida como poligênica e heterogênea, com contribuição importante do ambiente (multifatorial).

Entre as muitas adaptações sofridas pelo organismo para suportar a sobrecarga crônica de pressão encontra-se a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e o remodelamento vascular. Os resultados do *Framingham Heart Study* demonstraram de forma inequívoca o valor prognóstico da detecção de hipertrofia ventricular esquerda na estratificação de risco para doença cardiovascular, morbidade e mortalidade. A avaliação da espessura íntima - média das paredes anterior e posterior da carótida, utilizando ultra-som de alta resolução, vem sendo usado na detecção precoce de remodelamento vascular e como marcador precoce de aterosclerose.

A produção endotelial de NO é a maior contribuinte do relaxamento da musculatura lisa vascular. A inabilidade de liberação de NO ou disfunção endotelial, pode ser avaliada de forma não invasiva, quantificando-se a resposta da artéria braquial ao estímulo mecânico como a resposta à manobra de compressão/descompressão da artéria braquial ou após estímulo farmacológico de substâncias vasodilatadoras, como a nitroglicerina, cuja ação é direta sobre a musculatura lisa vascular.

Uma abordagem genética permite investigar a participação dos polimorfismos de base única dos genes (SNP) que codificam os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona, tais como, o polimorfismo I/D da enzima conversora da angiotensina e a variante M235T do angiotensinogênio e o polimorfismo Glu-Asp do gene para sintase endotelial do óxido nítrico em pacientes com hipertensão arterial refratária.

Foram estudados, 220 indivíduos, dos quais 70 eram hipertensos refratários (HAR), 80 responsivos a tratamento farmacológico (HT) e 70 indivíduos controles (CT).

Os objetivos do presente estudo foram: 1) caracterizar e analisar comparativamente perfil clínico, demográfico, antropométrico e bioquímico de pacientes com HAR, HT e CT; 2) avaliar a massa do ventrículo esquerdo (HVE), a espessura íntima - média (EIM) das carótidas e quantificar a reatividade vascular, visando identificar alterações morfológicas e funcionais cardiovasculares; 3) analisar marcadores genéticos (SNP) dos genes do AGT, da ECA e da eNOS, visando esclarecer mecanismos básicos de controle da PA, incluindo a identificação de predisposição individual à HAR; 4) avaliar a associação dos polimorfismos da AGT, ECA e eNOS, com as alterações morfológicas e funcionais cardiovasculares.

Os principais resultados do presente estudo mostraram: a) semelhante prevalência de indivíduos não caucasianos e caucasianos, aumento do índice de massa corporal, elevação da concentração sérica de aldosterona, da atividade plasmática da renina e da excreção urinária de sódio em pacientes com HAR; b) presença de alterações morfológicas caracterizadas por HVE e aumento da EIM das carótidas (remodelamento cardiovascular) e alterações funcionais qualificadas como alteração da vasodilatação dependente (VMF) e não dependente do endotélio; c) elevada prevalência do genótipo T/T do polimorfismo M235T do gene para angiotensinogênio e do genótipo Glu-Glu para eNOS nos pacientes com HAR, ambos em correlação estatisticamente significativa com alterações morfológicas e funcionais cardiovasculares.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que: HAR tem distribuição étnica equivalente e que apresentam fatores associados como: aumento do IMC e hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona; fenótipos intermediários caracterizados por remodelamento cardiovascular (HVE e aumento da EIM das carótidas) e alterações funcionais representadas pela disfunção vascular dependente e não-dependente do endotélio, estão envolvidas na expressão fenotípica de pacientes com HAR e HT.

O genótipo T/T do polimorfismo do gene para AGT e o Glu-Glu da eNOS têm maior prevalência em pacientes com HAR, contudo somente o genótipo TT do polimorfismo para AGT apresenta correlação com alterações estruturais e funcionais cardiovasculares. Enquanto, os genótipos Glu-Glu e Glu-Asp se correlacionam somente com alterações funcionais.

Capa abstract

Refractory hypertension (HAR) is defined, according to the Seventh Joint National Committee (JNC VII), when the systolic arterial pressure remains above 140 mmHg and the diastolic arterial pressure above 90 mmHg even when taking three or more classes of anti-hypertensive agents including full-dose of a diuretic and the other agents at sub maximum doses with good compliance to both non-pharmacological and pharmacological treatments.

The pathophysiology of arterial hypertension, including refractory hypertension, is complex; it is modulated by several interlinked factors including the autonomic nervous system, vascular smooth muscles (endothelium-nitric oxide) and kidneys, as well as the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). Thus the pathophysiology of arterial hypertension is considered polygenic and heterogeneous with significant involvement of the environment (multifactorial).

Among the many changes suffered by the organism to cope with the chronic pressure overload are left ventricular hypertrophy (LVH) and vascular remodeling. The results of the Framingham Heart Study unequivocally demonstrated the prognostic value of detecting left ventricular hypertrophy in the stratification of risk for cardiovascular disease, morbidity and mortality. Assessment of the intima-media measurement of the anterior and posterior walls of the carotid artery utilizing high-resolution ultrasound is being used for the early detection of vascular remodeling and as an early marker of atherosclerosis.

The endothelium production of NO is the greatest contributor to vascular smooth muscle relaxation. Inability to release NO or endothelial dysfunction can be non-evasively evaluated by measuring the brachial arterial response to mechanical stimuli such as the response to a compression/decompression maneuver or after pharmacological stimulus using vasodilator agents, including nitroglycerine which acts directly on the vascular smooth muscle.

An approach using genetics allows the investigation of the participation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) which code to components of the renin-angiotensin-aldosterone system which include the I/D polymorphism of the angiotensin-conversion enzyme gene (ACE), the M235T angiotensinogen gene

polymorphism (AGT) and the Glu-Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (eNOS) in patients with refractory hypertension.

A total of 220 individuals were studied including 70 patients with refractory hypertension (HAR), 80 responsive to pharmacological treatment (HT) and 70 control subjects (CT). The objectives of this study were: 1) to characterize and comparatively analyze the clinical, demographic, anthropometric and biochemical profile of the HAR, HT and CT individuals; 2) to evaluate the left ventricle mass (LVH), the intima-media thickness (IMT) of the carotid arteries and measure the vascular reactivity aiming at identifying morphological and cardiovascular functional alterations; 3) analyze the SNP genetic markers of the AGT, ACE and eNOS genes aiming at elucidating the basic control mechanisms of arterial pressure including identifying the individual predisposition to HAR; 4) to evaluate the association of the AGT, ECA and eNOS polymorphisms with the morphological and cardiovascular functional changes.

The main results of the current study showed: a) similar prevalence in non-Caucasian and Caucasian individuals, increases in the body mass index, elevations in the serum aldosterone concentrations, the plasma renin activity and of the sodium urine excretion in patients with HAR; b) the presence of morphological changes characterized by LVH, an increase of the IMT of the carotid arteries (cardiovascular remodeling) and functional changes such as endothelial dependent and independent vasodilation; c) a higher prevalence of the TT genotype of the M235T ATG gene polymorphism and of the Glu-Glu genotype of the eNOS gene in patients with HAR.

In conclusion HAR has an ethnically equivalent distribution and presents associated factors such as: an increase in the body mass index and hyperactivity of the RAAS; intermediary phenotypes characterized by cardiovascular remodeling (LVH and an increase of the IMT of the carotid arteries) and functional alterations represented by endothelial-dependant and independent vascular dysfunction, are involved in the phenotypic expression.

The TT genotype of the AGT gene polymorphism and the Glu-Glu of eNOS gene have a higher prevalence in patients with HAR, however only the TT genotype of the AGT gene polymorphism is associated with both structural and functional cardiovascular alterations. The Glu-Glu and Glu-Asp genotypes have correlations with functional alterations alone.

Capa introdução

1- Considerações Gerais

A hipertensão arterial (HA) destaca-se como maior fator de risco independente relacionado à doença cardiovascular (DCV); (Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group, (1990; KANNEL, 1993) e permanece como o maior fator de risco modificável, apesar do importante avanço no conhecimento da sua fisiopatologia e disponibilidade de métodos efetivos para o seu tratamento. Atualmente, nos Estados Unidos, aproximadamente um milhão de mortes por ano é atribuído a doenças cardiovasculares (DCV) [National Center For Health Statistics, 2002], (KANNEL, 1996; MININO *et al.*, 2002). Dessas, 51% são provocadas por doença arterial coronariana (DAC), 27% são devido a outras doenças cardíacas, incluindo a insuficiência cardíaca (ICC), 16% ocasionadas por acidente vascular cerebral (AVC), 4% por doenças vasculares periféricas e os 2% restantes por outras situações mórbidas associadas à doença cardiovascular (KANNEL, 1996; LEWINGTON *et al.*, 2002).

As complicações diretas da hipertensão arterial chamadas de complicações “mecânicas” incluem o acidente vascular cerebral hemorrágico, a hipertrofia ventricular esquerda, a nefro esclerose e a dissecação da aorta torácica. As complicações indiretas relacionadas à “aterosclerose” incluem a doença arterial coronariana obstrutiva, a doença vascular cerebral isquêmica, e a 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 acidente vascular cerebral e doença arterial coronariana: cinco vezes maior do que em adultos normotensos da mesma faixa etária (KANNEL, 1999).

2- Conceituação, Prevalência e Diagnóstico da Hipertensão Arterial

A pressão arterial (PA) é uma característica quantitativa altamente variável (PARATI *et al.*, 1998). Em estudos populacionais a PA tem distribuição normal com discreto desvio para direita, ocorrendo, correlação contínua e positiva entre níveis

pressóricos e risco de DCV (AVC, infarto agudo do miocárdio [IAM] e ICC), doença renal e mortalidade mesmo na faixa de normotensão (CUTLER, 1996; KANNEL, 1999). Esta correlação é mais marcante com a pressão arterial sistólica (PAS) que com a pressão arterial diastólica (PAD). Entretanto, não há nível específico de PA que determine o início das complicações cardiovasculares ou renais, uma vez que, a definição de HA é arbitrária, mas necessária por razões práticas de diagnóstico e tratamento (LEWINGTON *et al.*, 2002).

O diagnóstico de HA é feito quando as médias em duas ou mais tomadas da PAS em duas visitas consecutivas é maior ou igual a 140 mmHg ou quando as médias em duas ou mais tomadas da PAD em duas visitas consecutivas é maior ou igual a 90 mmHg e HA sistólica isolada quando a PAS é maior a 140 mmHg e a PAD menor que 90 mmHg (IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, (2004). A base necessária para avaliação da HA é a acurácia da mensuração da PA (BEEVERS *et al.*, 2001a; BEEVERS *et al.*, 2001b; O'BRIEN *et al.*, 2001a; O'BRIEN *et al.*, 2001b).

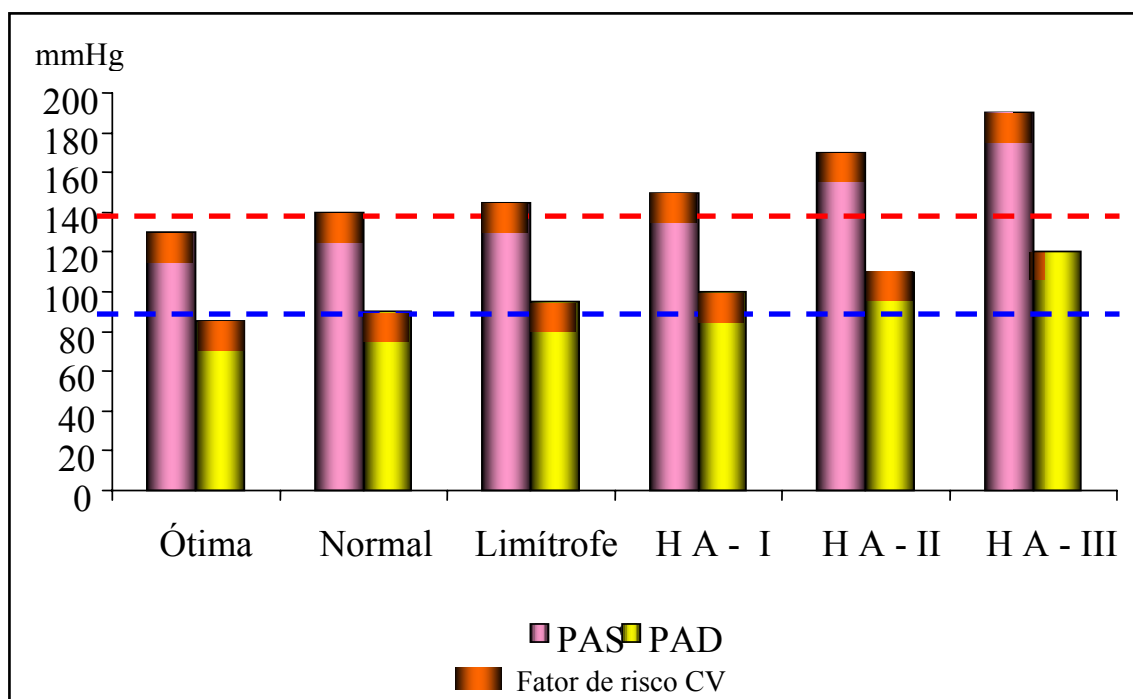
Indivíduos com PA normal alta mantêm médias pressóricas acima da média populacional e apresentam maior risco para desenvolvimento definitivo de HA e eventos cardiovasculares que a população em geral. Utilizando estas definições, estima-se que 24% da população adulta americana seja hipertensa. Ocorrendo uma variação proporcional com a raça; (32,4% - Afro-Americanos; 23,3% - Brancos e 22,6% - México - Americanos), idade (ocorrendo maior elevação da PAD até os 55-60 anos e da PAS nas populações mais idosas, variações geográficas são freqüentes, sendo mais prevalentes no sudeste dos EUA), sexo (HA é mais prevalente em homens, a menopausa parece abolir esta diferença) e nível sócio-econômico, o qual é um indicador de estilo de vida e está inversamente relacionado à prevalência, morbidade e mortalidade devido a HA (QURESHI *et al.*, 2005). A prevalência exata da hipertensão arterial no Brasil não é conhecida. De acordo com os dados disponíveis, a prevalência varia de 14% a 47%; entretanto, esses estudos restringiram-se a determinadas regiões. (DE LOLIO, 1990; FREITAS *et al.*, 2001; FUCHS *et al.*, 1994).

2.1- Fatores associadas à elevação da PA

Hipertensão arterial primária é definida como sendo a elevação da PA, na qual causas de HA secundária estão ausentes. HA primária responde por 95% dos casos de hipertensão arterial. É frequentemente indicado que a HA primária não tem causa conhecida. Esta afirmativa é parcialmente verdadeira, porque temos algumas informações sobre variações genéticas ou genes que estão supra ou sub-expressos, como os fenótipos intermediários que regulam os sistemas renina angiotensina-aldosterona, sistema nervoso simpático, endotélio vascular, os sistemas renais calicreína-cininas e canais tubulares de sódio que estão envolvidos na fisiopatogênese da HA (LUFT, 1998). Outros fatores que aumentam a PA incluem: obesidade, resistência insulínica, ingestão de álcool, aumento da ingestão de sódio (principalmente em pacientes sensíveis a sal), idade, sedentarismo, estilo de vida, estresse emocional e baixa ingestão de potássio e cálcio.

Variações da PA podem ser geneticamente determinadas e são denominadas variações hereditárias da PA. Entretanto, não se tem conhecimento de quais são os genes responsáveis por esta variação, sabemos de estudos com famílias que a PA pode variar desde níveis baixos de PA até hipertensão grave. Por outro lado, fatores que elevam a PA como obesidade, ingestão de álcool e excesso de sal são denominados de fatores hipertensogênicos. Alguns desses fatores são hereditários, comportamentais e ambientais. O padrão de PA herdado pode ser considerado o núcleo sobre o qual, fatores hipertensogênicos causam elevação da PA acima dos valores hereditariamente determinados criando situações como as seguintes: pacientes com PA ótima ($<120/<80$ mmHg), quando submetidos a um ou mais destes fatores apresentaram elevação da PA para níveis $<135/<85$ mmHg mantendo-se ainda, dentro da variação normal.

Por outro lado, em pacientes com PA hereditariamente determinada em torno de 130/85 mmHg, adição de um ou mais fatores hipertensogênicos elevará a PA a valores de pré-hipertensão 130-139/85-90 mmHg ou a estágio 1 (PA 140-159/90-99 mmHg). Todavia, partindo de um nível de PA na categoria pré-hipertensão a adição desses fatores elevará a PA para valores $>140/>90$ mmHg. Finalmente, pacientes com hipertensão arterial em estágio 1 ou 2 apresentando um ou mais fatores hipertensogênicos adicionais passaram para estágio 2 ou 3 respectivamente (CARRETERO e OPARIL, 2000) (Figura 1).



PAS= pressão arterial sistólica; PAD= pressão arterial diastólica; CV= cardiovascular; HA= hipertensão arterial. (Adaptado de CARRETERO e OPARIL, 2000).

Figura 1- Interação entre fatores de risco cardiovascular e pressão arterial (PA) basal.

Teoricamente, uma população não afetada por fatores hipertensogênicos, mostrará uma PA com distribuição normal alongada para direita com base estreita, ou seja, menor variância. Quando um fator hipertensogênico é adicionado a esta população, como aumento da massa corporal, uma modificação será o maior alongamento da curva para a direita e, conseqüentemente, a base e a variância serão maiores, tornando a curva suave. Se um segundo fator hipertensogênico for adicionado ao excesso de peso, como a ingestão de álcool, a curva ficará mais alongada para a direita, a variância aumentará e um maior número de indivíduos será caracterizado como hipertenso (Figura 2).

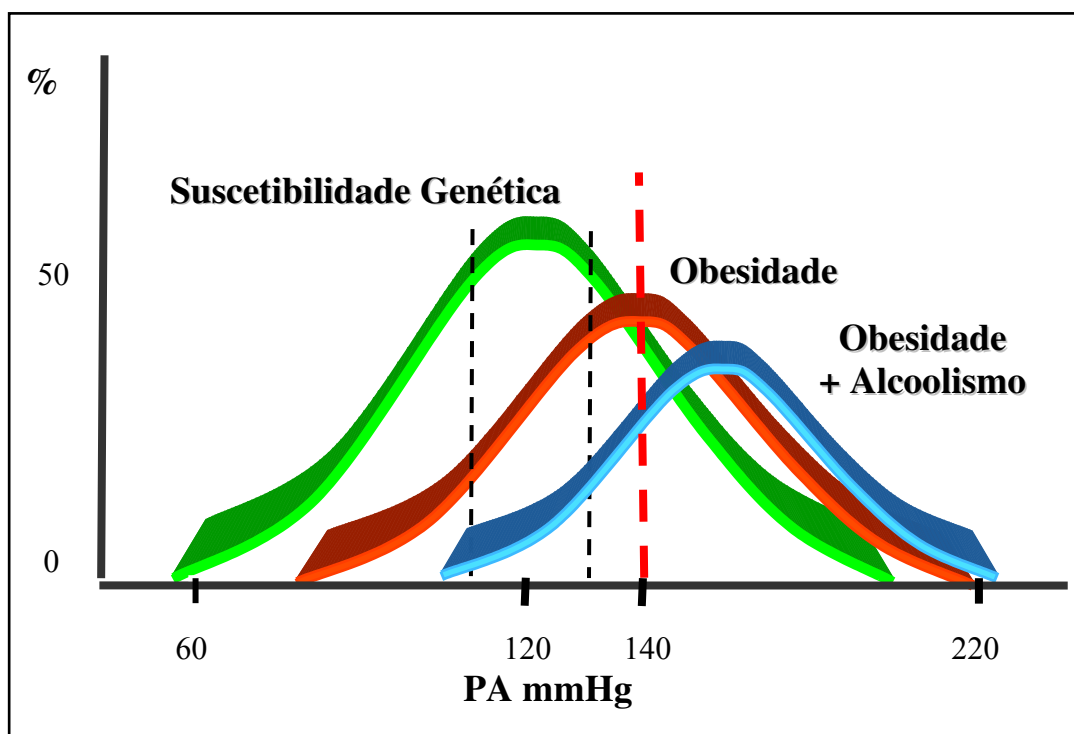


Figura 2- Interação entre fatores genéticos e ambientais e sua relação com a pressão arterial (PA) (Adaptado de CARRETERO e OPARIL, 2000).

Descobrir as variações genéticas que determinam o deslocamento da curva da PA para a esquerda ou direita tem importância teórica e prática e pode auxiliar no tratamento da HA (PHILLIPS, 1999). O reconhecimento de fatores hipertensogênicos como obesidade, resistência insulínica ou ingestão de álcool, incluem importantes componentes genéticos. Além disso, existem interações entre fatores genéticos e ambientais que influenciam os fenótipos intermediários como a atividade do sistema nervoso simpático, o sistema renina angiotensina-aldosterona, os sistemas renais calicreína-cininas e os fatores endoteliais, os quais por sua vez influenciam outros fatores intermediários como a excreção de sódio, a reatividade vascular e a contratilidade miocárdica. Estes e outros fenótipos intermediários determinam a resistência vascular periférica total e o débito cardíaco e, conseqüentemente, a PA (OPARIL *et al.*, 2003).

2.2- Hipertensão arterial refratária

A hipertensão arterial resistente ou refratária (HAR) é uma síndrome sem definição universalmente aceita, sendo a real prevalência também muito variável (ALDERMAN *et al.*, 1988; GIFFORD, 1988b; KAPLAN, 1995; LESHEM *et al.*, 2002). Alguns estudos sugerem variações em torno de 3% em programas de controle de HA cuidadosamente estruturados; outros alcançam até 29% em instituições de atendimento terciário especializado no tratamento de HA (CALHOUN *et al.*, 2002; GARG *et al.*, 2005; KAPLAN, 2005). Desta forma, a prevalência de HAR varia de acordo com a população estudada e as ferramentas diagnósticas e terapêuticas utilizadas. Apesar da diversidade de agentes farmacológicos disponíveis para o tratamento da hipertensão arterial, o relatório do *National Health Nutrition Education Survey* (NHANES III) (QURESHI *et al.*, 2005) revelou que somente 27% da população americana de adultos hipertensos têm a PA controlada (níveis <140/90 mmHg). A maioria (73%), que deveria estar controlada, não atinge as metas recomendadas pelos consensos (CHOBANIAN *et al.*, 2003). Uma explicação para resultados tão desapontadores estaria relacionada a sua natureza multifatorial. Entretanto, apesar da prescrição adequada de dois ou mais agentes anti-hipertensivos e acompanhamento apropriado em centros de tratamento especializado em hipertensão arterial, um expressivo número de hipertensos não alcança esses objetivos, sendo considerados refratários.

A definição atual de HAR fornecida pelo JNC VI (CHOBANIAN *et al.*, 2003), considera aquela em que, após duas consultas consecutivas, os valores pressóricos mantêm-se acima de 140 mmHg para PAS e 90 mmHg para PAD, a despeito de tratamento não farmacológico e farmacológico triplice, instituído incluindo diurético em pacientes que tiveram adesão plena ao tratamento dietético e medicamentoso.

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

Por exemplo, a expansão do volume plasmático como mediador da resistência à terapia (ALPER e CALHOUN, 1999; FROHLICH, 1988; GIFFORD, 1988a; TYKARSKI, 2005; VIDT, 2003).

Assim, mesmo afastadas todas as causas de pseudo-resistência, a HAR é freqüente na prática clínica e permanece sendo um desafio para a medicina. Na chamada pseudo-hipertensão, há discordância entre os valores pressóricos obtidos na avaliação com manguito braquial (os quais se encontram elevados) e os registrados de forma invasiva, através de cateterismo intra-arterial (invariavelmente menores). As causas mais comuns associadas a esta situação são: ateromatose arterial difusa e ou hiperplasia da camada média das artérias (ZUSCHKE e PETTYJOHN, 1995). A manobra de Osler pode ser realizada como primeira triagem. Consiste em insuflar o manguito braquial acima da PAS e palpar simultaneamente a artéria radial que permanece como um cordão endurecido e não compressível, caracterizando a manobra de Osler positiva (MESSERLI *et al.*, 1985). É discutível sua real validade no diagnóstico de pseudo-hipertensão. Outras manobras podem ser realizadas. Dispositivos não-invasivos de mensuração da PA podem ser utilizados (ZWEIFLER e SHAHAB, 1993). Destes, os equipamentos que usam métodos oscilométricos apresentam maior aproximação com os valores obtidos de forma invasiva por cateterismo intra-arterial, auxiliando na diferenciação entre pseudo-resistência ou pseudo-hipertensão e HAR verdadeira (ERNST e BERGUS, 2002).

2.2.1- Adesão ao tratamento

A adesão ao tratamento é definida como o grau de obediência do paciente à prescrição e às instruções médicas. Isto é, como o paciente cumpre as recomendações médicas, em termos de tomar a medicação prescrita, seguir a dieta, realizar mudanças no estilo de vida e comparecer às consultas médicas, coincidindo com a orientação médica estipulada (HORWITZ e HORWITZ, 1993).

Vários fatores exercem influência na adesão do paciente ao tratamento anti-hipertensivo. Entre eles, aqueles relacionados: 1- ao paciente: sexo, idade, etnia, estado civil, escolaridade e nível socioeconômico; 2- à doença: cronicidade,

ausência de sintomas e ou conseqüências tardias; 3- à hábitos de vida e culturais: a percepção da seriedade do problema, ignorância, experiência com a doença, contexto familiar conceito saúde-doença e auto-estima; 4- ao tratamento: custo, efeitos colaterais, esquemas terapêuticos complexos e qualidade de vida; 5- aos aspectos institucionais: política de saúde, acessos ao serviço público, distância, tempo de espera e tempos de atendimento (BANE *et al.*, 2006); 6. aos membros da equipe de saúde que assistem o hipertenso, especialmente, a relação médico-paciente que constitui fator de grande importância na adesão do hipertenso ao tratamento (GAVRAS, 2001). Desta forma, o controle inadequado da PA pode estar relacionado à falta de adesão, um simples, mas importante determinante do tratamento anti-hipertensivo e não a refratariedade, devendo, portanto, ser minuciosamente avaliado e excluído na caracterização da HAR.

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

Uma revisão de HAR, realizada em centro terciário de atendimento médico por Yakovlevitch e Black da Universidade YALE (YAKOVLEVITCH e BLACK, 1991) mostrou que a dosagem sub-terapêutica de anti-hipertensivos foi a causa mais freqüente de resistência ao tratamento medicamentoso (43% dos casos). A otimização das doses destes medicamentos, e particularmente o uso de diuréticos por via oral, permitiu controlar a PA dos pacientes referendados como refratários. Demonstrou-se, desta forma, que existe certa relutância por parte dos clínicos em prescrever diuréticos em doses apropriadas, à despeito das evidências, mostrando a importância do controle do fluído extracelular e do volume sangüíneo no tratamento da HA. Alguns pacientes são especialmente suscetíveis a determinados medicamentos, manifestando efeitos colaterais que levam a intolerância ao fármaco e abandono do tratamento, sendo eventualmente rotulados como hipertensos refratários.

2.2.3- Interações com drogas

Os antiinflamatórios não-esteroidais causam retenção de sódio, aumento da volemia, inibição dos efeitos das prostaglandinas vasodilatadoras em nível renal e aumento da resposta vasoconstritora aos hormônios vasopressores e, desta forma, elevam a PA. Alguns estudos de metanálise demonstraram que os antiinflamatórios elevam a PA média em aproximadamente 4 a 5 mmHg. Apenas a aspirina não participa desta importante interação medicamentosa (POPE *et al.*, 1993). Os contraceptivos orais provocam HA duas a três vezes mais freqüentemente em mulheres que os usam (DONG *et al.*, 1997; LUBIANCA *et al.*, 2003), especialmente em obesas e tabagistas. A suspensão do uso desses medicamentos normaliza a PA em alguns meses.

O uso de cocaína e anfetamina deve ser considerado em todos os pacientes que se apresentam nas unidades de emergência com problemas relacionados à hipertensão arterial (BRECKLIN *et al.*, 1998). A intoxicação aguda por anfetamina é similar àquela da cocaína, porém, mais prolongada podendo durar várias horas. Em pacientes em uso de beta-bloqueadores, a anfetamina ocasiona aumento paradoxal da PA, bem como vasoconstrição coronariana, devido à exagerada estimulação das catecolaminas sobre os alfa-receptores adrenérgicos não bloqueados (LANGE *et al.*, 1990).

As aminas simpatomiméticas, substâncias vasoativas como fenilpropanolamina, efedrina e oximetazolina, presentes em descongestionantes nasais, quando usados por períodos prolongados podem causar aumento da PA ou interferir com a ação das drogas anti-hipertensivas. Os efeitos das aminas simpatomiméticas resultam da atividade agonista alfa-adrenérgica pela estimulação direta de receptores adrenérgicos, e indireta pela facilitação da liberação de noradrenalina dos estoques neuronais (BRAVO, 1988).

Os antidepressivos tricíclicos antagonizam os efeitos hipotensores das drogas bloqueadoras adrenérgicas (p.e., guanetidina) por impedirem a captação dessas drogas anti-hipertensivas em terminações nervosas adrenérgicas. Interações similares também são observadas com clonidina e metildopa (ESLER *et al.*, 1995).

A ciclosporina tem efeito conhecido sobre a PA com relatos de desenvolvimento de hipertensão arterial em 50 a 70% dos pacientes transplantados. Vasoconstrição renal e diminuição da excreção de água são observadas em pacientes com HA induzida pela ciclosporina. Os corticóides promovem retenção de sal e água e HA volume dependente, por apresentarem atividade mineralocorticóide (TALER *et al.*, 1999).

2.2.4- Condições associadas

Desde o início do século XX, estudos epidemiológicos têm demonstrado associação entre HA e consumo de álcool, sendo considerada uma causa comum de elevação reversível da PA. A contribuição do álcool sobre a prevalência de HA na população varia de acordo com a quantidade ingerida e da população em estudo. O consumo de doses maiores que 30 ml de etanol por dia está relacionado a aumento da pressão arterial (CUSHMAN, 2001). Os efeitos do álcool sobre a PA, aparentemente não são mediados por alterações estruturais, e sim por mudanças vasculares funcionais reversíveis, com participação do sistema nervoso simpático, substâncias vasoativas e alterações do transporte celular de eletrólitos. A resistência à terapia anti-hipertensiva também tem sido relacionada ao consumo de álcool, por interferência direta sobre os efeitos das drogas hipotensoras ou associadas à pseudo-resistência ocasionada pela má adesão ao tratamento observada em alcoólatras (THADHANI *et al.*, 2002).

O ato de fumar um cigarro causa elevação transitória da PA, sendo a duração do efeito na elevação dos níveis pressóricos influenciada pelo número de cigarros consumidos por dia. Estudos experimentais em humanos e animais têm demonstrado que o mecanismo pelo qual o tabagismo promove estas alterações está associado ao efeito da nicotina sobre a liberação de catecolaminas neuronais e das supra-renais, os quais aumentam a frequência cardíaca, volume sistólico, contratilidade miocárdica, promovem vasoconstrição sistêmica e aumento de fluxo para musculatura esquelética.

A nicotina atua sobre o eixo hipotálamo-hipófise estimulando a secreção do fator liberador de corticotrofina, aumenta os níveis de endorfina, hormônio adreno-corticotrófico (ACTH) (BENOWITZ e JACOB, 1984), vasopressina e corticosteróides proporcionalmente à concentração plasmática alcançada (BANG *et al.*, 2000). Outro importante efeito da nicotina sobre o sistema cardiovascular é relacionado à alteração da função endotelial demonstrada em estudos de complacência venosa de veia dorsal da mão em tabagistas (MORENO *et al.*, 1998). Também a administração de nicotina transdérmica (adesivos) em não tabagistas ou tabagistas de grau leve pode causar disfunção endotelial (SABHA *et al.*, 2000; TANUS-SANTOS *et al.*, 2001; YUGAR-TOLEDO *et al.*, 2004). Desta forma, o tabagismo está associado à elevação persistente da pressão arterial e aumento da variabilidade pressórica (BENOWITZ *et al.*, 2002; HALIMI *et al.*, 2002; YUGAR-TOLEDO *et al.*, 2005b). Por outro lado, os efeitos da terapia anti-hipertensiva com betabloqueadores encontram-se atenuados em hipertensos tabagistas (MATERSON *et al.*, 1988).

Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que o excesso de peso eleva a PA. O mecanismo exato pelo qual a obesidade provoca esta alteração não está totalmente esclarecido. Sabe-se que obesidade está associada a aumento do débito cardíaco, resistência vascular periférica e fluxo sanguíneo regional, que promovem expansão do volume extracelular e alteração da função renal, manifestada por alteração da curva pressão/natriurese e retenção renal de sódio. Inicialmente, por um aumento da reabsorção tubular na fase inicial da obesidade, e posteriormente, secundária a lesão glomerular com perda de função (HALL, 1997; HALL *et al.*, 2001). Outro importante fator é a atividade plasmática da renina que está aumentada em obesos, independente da retenção de sódio e aumento do volume extracelular. O papel da angiotensina II é reforçado pela eficácia observada no tratamento de jovens obesos hipertensos com inibidores da enzima conversora de angiotensina (ROCCHINI, 2002).

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

idade, sexo e índice de massa corporal (HALL *et al.*, 1994). Isto sugere que a hipertrofia do músculo liso dos vasos de resistência induzida pela insulina seja responsável pelo aumento da resistência vascular periférica em pacientes obesos com resistência à insulina e HA. Finalmente, a obesidade e a hiperinsulinemia bloqueiam a efetividade das drogas anti-hipertensivas, contribuindo desta maneira para resistência ao tratamento medicamentoso da HA.

A apnéia obstrutiva do sono deve ser considerada como causa de HAR em todo paciente obeso que apresenta episódios de apnéia durante o sono. Tem sido documentado, que mais de 40% dos pacientes com HAR são portadores de apnéia obstrutiva do sono não diagnosticada (SILVERBERG *et al.*, 1997). A monitorização ambulatorial da PA (MAPA) mostra que estes pacientes não apresentam descenso noturno com a variação do ritmo circadiano e a monitorização do sono confirma a presença de vários episódios de apnéia e hipóxia durante o sono caracterizando o quadro (SMITH *et al.*, 1996). As alterações hemodinâmicas agudas que ocorrem durante a apnéia obstrutiva do sono incluem: hipertensão sistêmica e pulmonar, aumento da pré-carga ventricular esquerda e direita, e diminuição do débito cardíaco.

2.2.5- A importância da sobrecarga volêmica

Um dos principais fatores determinantes da PA e da composição aquosa do corpo é o equilíbrio entre a ingestão oral e a excreção renal e perda extra-renal, regulados pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), peptídeo natriurético atrial (PNA) e os receptores atriais e renais de pressão (LARAGH, 2001). A sobrecarga de volume que acompanha um balanço positivo de sódio corporal representa uma importante causa de HAR. Várias situações comuns estão associadas a esta condição, como por exemplo, a excessiva ingestão de sal levando a elevação da PA em pacientes hipertensos recebendo medicação anti-hipertensiva. Quando a sobrecarga de volume é provável, a avaliação da excreção de sódio na urina de 24 h nos permite descartar uma falsa restrição salina informada pelo paciente.

2.2.6- Hipertensão arterial secundária

A resistência ao tratamento anti-hipertensivo em pacientes com boa adesão chama a atenção para o diagnóstico de HA secundária. Entre as várias causas de HA secundária existentes e descritas na literatura (AKPUNONU *et al.*, 1996), as mais freqüentemente encontradas em serviços de atendimento especializado são descritas abaixo.

A estenose da artéria renal que é a causa tratável mais comum de HA secundária, deve ser suspeita diagnóstica em hipertensos com história de recente começo, ou hipertensos que não respondem a um tratamento que anteriormente controlava a PA. O renograma com captopril e o ultra-som Doppler de artéria renal são procedimentos de boa sensibilidade para detecção de estenose da artéria renal de grau importante. A angio-ressonância após injeção de gadolínio tem sido indicada para visualização da aorta e das artérias renais, reservando-se a angiografia para estudos com indicação de intervenção transluminal com ou sem implante de endopróteses (KLONER *et al.*, 2002).

Atualmente, admite-se que o hiperaldosteronismo primário seja responsável por cerca de 5-15% dos casos de HA secundária. Entretanto, mais de 30% dos pacientes com hiperaldosteronismo primário apresentam HAR, muitos deles sem hipopotassemia (STOWASSER *et al.*, 2001). As duas principais causas de hiperaldosteronismo primário são a hiperplasia adrenal idiopática (HAI) e o adenoma produtor de aldosterona, sendo maior a prevalência de hiperplasia adrenal idiopática entre homens (proporção 4:1), negros e após a sexta década de vida. Adenomas são mais comuns em mulheres (proporção de 2:1), entre 30-50 anos de idade. A concentração plasmática de aldosterona (CPA) e a relação entre a CPA e a atividade da renina plasmática (ARP) são testes úteis para triagem, mas não selam o diagnóstico. O diagnóstico é feito através da quantificação da aldosterona urinária de 24h. A tomografia computadorizada com contraste, apesar de útil não detecta cerca de 50% dos adenomas, sendo a dosagem de aldosterona da veia supra-renal considerada o padrão-ouro para determinar a lateralidade da doença (RAYNER, 2002). O tratamento é cirúrgico nos casos de adenoma, e essencialmente clínico nos casos de hiperplasia (YOUNG, 2002).

O feocromocitoma é um tumor de origem neuroectodérmica com localização predominantemente supra-renal, podendo também se localizar em tecidos cromafins (origem simpática extra-adrenal 10%, dos casos denominados paragangliomas). Estes tumores são encontrados em todas as idades e em ambos os sexos, e são mais comumente diagnosticados na quarta e quinta década de vida. A HA, pode apresentar-se como crises paroxísticas, porém em aproximadamente metade dos casos manifesta-se como HAR. As manifestações laboratoriais inespecíficas incluem: hiperglicemia, acidose láctica, hipopotassemia (secundária a diarreia), hipercalcemia, aumento dos ácidos graxos livres circulantes, policitemia devido ao aumento da produção de eritropoietina pelas células tumorais, aumento das transaminases, enzimas pancreáticas e cardíacas como resultado de grave vasoconstrição e isquemia. O diagnóstico definitivo estabelecido pela demonstração de níveis elevados de catecolaminas urinárias epinefrina e norepinefrina e também pela elevação dos níveis plasmáticos de dopamina (BRAVO, 2002). Os métodos de localização do feocromocitoma incluem tomografia computadorizada, ressonância magnética nuclear, cintilografia e mapeamento com metaiodobenzilguanidina. (MIBG) (PACAK *et al.*, 2002). O tratamento definitivo é cirúrgico (WALTHER, 2002).

3- Aspectos Genéticos da Hipertensão Arterial

As evidências demonstrando que a PA é geneticamente determinada, vêm de estudos de correlação de níveis pressóricos entre parentes, como por exemplo, o coeficiente de correlação para PA entre gêmeos monozigóticos, que é aproximadamente 75%; enquanto, este coeficiente de correlação para irmãos não gêmeos é aproximadamente 25% (FEINLEIB *et al.*, 1977). Estes valores indicariam uma importante influência de genes nos níveis pressóricos sanguíneos, entretanto, outros fatores estão envolvidos, de forma que, entre parentes do mesmo grau de relacionamento genético existem diferenças significantes em relação à PA. Assim, o coeficiente de correlação entre gêmeos dizigóticos e de irmãos não gêmeos que têm similaridade genética, é de 50% em ambos os casos. Da mesma forma, a correlação entre pais e descendentes que tem 50% do material genético, o coeficiente de correlação é usualmente menor que o encontrado entre irmãos.

Estas diferenças são imputadas a fatores não genéticos como os fatores ambientais (BIRON *et al.*, 1976; LONGINI *et al.*, 1984).

Dessa forma, a herança na HA é complexa, assumida como poligênica e heterogênea (envolve constelações diferentes de genes em pessoas diferentes), com contribuição importante do ambiente (multifatorial). (HARRAP, 1994; KIM, H. S. *et al.*, 1995).

Os recentes estudos de biologia molecular permitiram definir algumas causas genéticas com características Mendelianas de hipertensão arterial como: hiperaldosteronismo responsivo a corticóides, síndrome de Liddle (excesso aparente de mineralo-corticóide) (SHIMKETS *et al.*, 1994), síndrome de Gordon (pseudo-hipoaldosteronismo tipo I) (ARNOLD e HEALY, 1969); síndrome de Gitelman, síndrome de Barter, doença renal policística e outras (LIFTON, 1996; LIFTON *et al.*, 1992; LIFTON *et al.*, 2001; RISCH, N., 1990; SIMON, D. B. *et al.*, 1996a; SIMON, D. B. *et al.*, 1996b; SIMON, D. B. *et al.*, 1996c). Estas síndromes são freqüentemente indistinguíveis e heterogêneas em nível molecular. Uma enorme variedade de mutações em genes particulares, ou mesmo mutações de outros genes, podem resultar no mesmo quadro clínico. Mutações no DNA podem provocar efeitos sobre a atividade enzimática, transporte e sinalização celular transmembrana, convergindo para manifestação fenotípica usualmente semelhante (LUFT, 1998; SHIMKETS e LIFTON, 1996; WILLIAMS, G. H., 1994).

A identificação de variações de genes (alelos) que contribuem para o desenvolvimento de HA é complicada, pelo fato de dois fenótipos que determinam pressão arterial, o débito cardíaco e a resistência periférica estarem controlados por fenótipos intermediários incluindo atividade do sistema nervoso simpático, SRAA, sistemas renais calicreína-cininas e fatores endoteliais, os quais por sua vez influenciam outros fatores intermediários como a excreção de sódio, a reatividade vascular e a contratilidade miocárdica (WILLIAMS, J. D. e COLES, 1994). Além disso, esses fenótipos intermediários são também controlados por mecanismos complexos incluindo o próprio

nível de PA. Desta forma, existem muitos genes que podem participar no desenvolvimento da HA.

A localização de regiões no DNA responsáveis por determinado fenótipo é facilitada pela identificação de marcadores polimórficos ou seqüências de DNA em localizações específicas no genoma que podem variar individualmente, definindo diferentes alelos. O termo polimorfismo é utilizado para referir-se a uma série de variações genéticas estáveis presentes ao menos em 1% da população. Polimorfismos genéticos ocorrem devido à substituição de uma base nitrogenada (nucleotídeo), inserção ou deleção de seqüências de DNA e finalmente por variações do número de repetições de bases nitrogenadas em tandem. O tipo mais comum de polimorfismo é o chamado polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* - SNP). O polimorfismo de nucleotídeo único é resultado da substituição de um único par de bases da seqüência de DNA, sendo o tipo mais comum de variação genética inter-individual. Estima-se que um polimorfismo em um único nucleotídeo (pontual) ocorre em cada 1.000 pares de bases.

O genoma completo possui 3 a 10 milhões de polimorfismos de base única, destes, aproximadamente 1-1,5 milhões foi caracterizado pelo consórcio internacional de detecção de polimorfismos de base única (SACHIDANANDAM *et al.*, 2001). Muitas destas alterações estão presentes em seqüências de DNA que não são codificadoras, as quais correspondem a 90% do DNA total. Assim, apenas uma minoria dos polimorfismos pontuais pode ser detectada dentro dos genes.

Os polimorfismos de base única, presentes nas seqüências de DNA que são codificadores (chamados “*coding* SNP”) podem produzir alterações se o código genético for modificado ocasionando uma substituição de um aminoácido resultando em uma modificação quantitativa na estrutura da proteína (e na sua função) ou alteração da expressão da proteína quando o polimorfismo ocorre na região promotora (SUNYAEV *et al.*, 2001). Por outro lado, alguns polimorfismos posicionados tanto em seqüências reguladoras como nos íntrons, podem afetar a transcrição aumentando ou diminuindo essa transcrição. Devido à redundância da cadeia genética, determinados polimorfismos não resultam em qualquer efeito (RISCH, N. J., 2000).

4- Endotélio

Os vasos sanguíneos estão revestidos internamente por uma camada tênue de células denominado ‘endotélio’. Esta membrana constitui um verdadeiro órgão multifuncional, essencial para fisiologia cardiovascular normal, pois, quando disfuncionante, passa a ser um fator crítico na fisiopatogenia da doença cardiovascular (SIMIONESCU e SIMIONESCU, 1986; VANE *et al.*, 1990).

Anatomicamente o endotélio delimita a área de separação física do compartimento intravascular dos demais tecidos e órgãos do corpo humano. Biologicamente esta interface executa considerável número de funções vitais (GIMBRONE, 1999; LUSCHER e BARTON, 1997; VOGEL, 1997). Entre elas destacam-se as funções descritas a seguir: a) barreira de permeabilidade seletiva e regulação do transporte de pequenas moléculas. b) Capacidade de monitoração, integração e tradução de sinalizações através da expressão dos receptores de superfície para várias citocinas, interleucinas 1α e 1β , (IL- 1α , e IL- 1β), fator de necrose tumoral α (TNF α), interferon γ (IFN γ), fator transformador do crescimento β (TGF β), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator endotelial de crescimento vascular (VEGF), fator de permeabilidade vascular, e outros, como a insulina e os fatores tipo insulina ou ainda os produtos bacterianos como as endotoxinas e suas proteínas de ligação que regulam importantes respostas teciduais. c) Propriedade antitrombótica mediada pela síntese de óxido nítrico, inibindo a agregação, adesão e ativação plaquetária. d) Interação com sistemas fibrinolíticos; e capacidade de produzir substâncias trombogênicas, como fatores da coagulação, moléculas de adesão, inibidor do ativador do plasminogênio e tromboxano A_2 (WU, 1996; WU e THIAGARAJAN, 1996). e) Inibição da proliferação celular da musculatura lisa vascular (CMLV), impedindo a migração de CMLV através de mecanismos diretos como, a síntese de óxido nítrico, que inibe a proliferação celular, e ou indiretos (ação plaquetária), ou ainda, secretando fatores de crescimento e outras citocinas capazes de exercer controle autócrino, e ou parácrino da multiplicação celular. f) Regulador de vários fenômenos da resposta imunológica, por meio da contração ativa, atividade fagocitária (inclusive bactérias), controle do extravasamento de plasma, da expressão de integrinas, moléculas de adesão e secreção de citocinas,

permitindo a migração de monócitos, linfócitos e neutrófilos (DE CATERINA, 2000; KUBES *et al.*, 1991; WALPOLA *et al.*, 1995). g) Participação na degradação e transformação metabólica de numerosos fármacos endógenos, como norepinefrina, 5-hidroxitriptamina, prostaglandinas E e F, leucotrienos, nucleotídeos de adenina, adenosina e outros. h) Controle do tono vascular, mediado por substâncias vasoativas (BASSENGE e MUNZEL, 1988), principalmente pelo óxido nítrico (NO, antagonista fisiológico de substâncias vasoconstritoras endógenas como catecolaminas, angiotensina II e endotelina-1), também pela prostaciclina, bradicinina, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), metabólitos das monoxigenases e outras (COHEN e VANHOUTTE, 1995; COOKE e DZAU, 1997; MONCADA *et al.*, 1991; PALMER *et al.*, 1987).

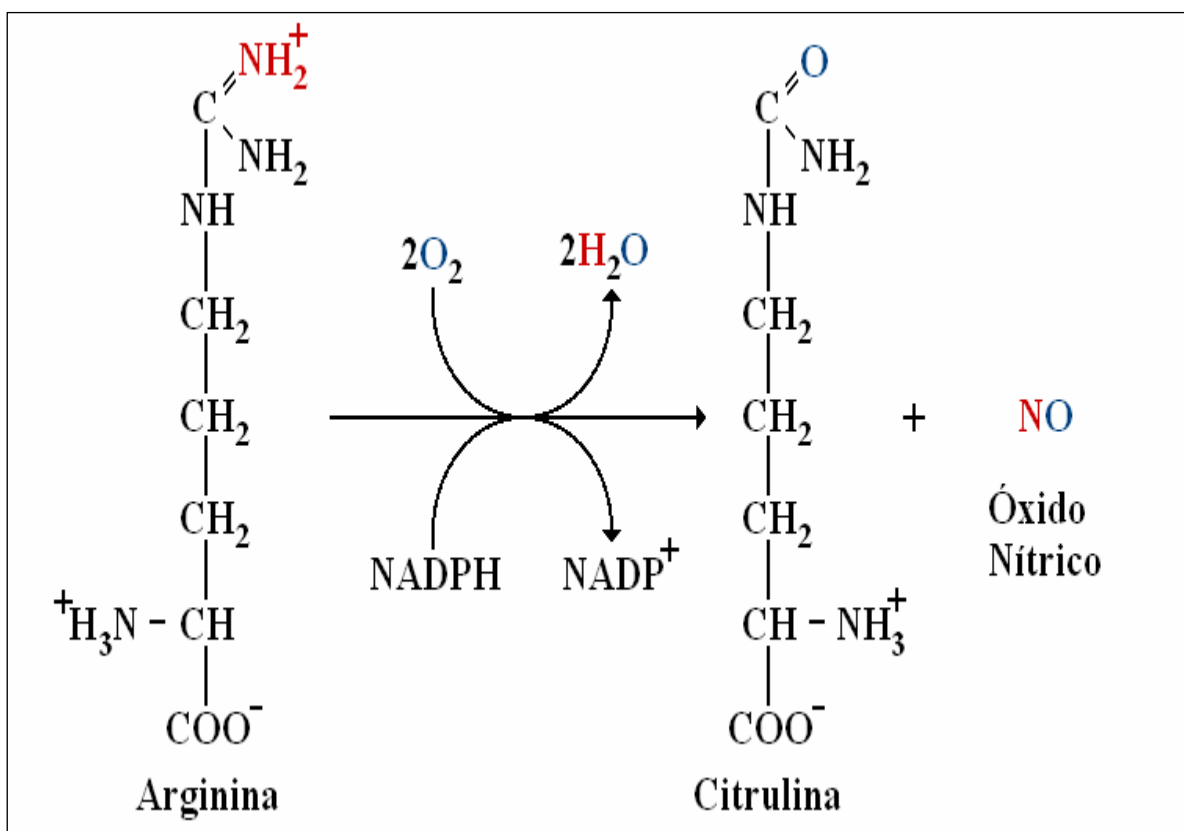
5- Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) descrita por Furchgott e Zawadzki (1980) caracteriza-se como uma substância não prostanóide, lábil e difusível, mediadora do relaxamento dependente do endotélio. É formado a partir do nitrogênio-guanidino terminal do aminoácido L-arginina, pela enzima NO sintase endotelial (eNOS) que é constitutiva (NO sintase III) na célula endotelial. A NOS produz o NO em duas etapas de oxidação, utilizando o oxigênio molecular (O₂). Na primeira etapa, ocorre a formação de N⁽¹⁾-Hidroxi-L-arginina (reação que se assemelha às do citocromo P-450), e na etapa posterior a N⁽¹⁾-Hidroxi-L-arginina é convertida em NO e L-citrulina (utilizando NADPH e O₂) (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; MONCADA *et al.*, 1991).

A ativação da eNOS depende da concentração intracelular de íons cálcio nas células endoteliais e é também calmodulina-dependente, requerendo nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e 5,6,7,8 hidrobipterina (HB) para atividade ótima. A enzima pode ser inibida de forma competitiva por análogos da L-arginina, como L-NMMA e L-NAME. O NO difunde-se em direção às células musculares lisas vasculares e as relaxa pela estimulação da enzima citosólica guanilato ciclase solúvel, que aumenta a biodisponibilidade do GMP cíclico (IGNARRO, 1994;

MURAD, 1994). O aumento de GMP cíclico, cuja ação nos tecidos de mamíferos é mediada principalmente pela ativação da proteína quinase G, diminui o influxo de cálcio para o citoplasma e aumenta a captação em nível $\text{Ca}^{++}/\text{ATPase}$ pelo retículo sarcoplasmático ou por interação direta em nível de proteínas contráteis (HIRATA, M. e MURAD, 1994; WARNER *et al.*, 1994).

Adicionalmente, o NO pode causar relaxamento muscular por interação com canais de potássio diretamente ou através do aumento de GMP cíclico e também regula a produção de endotelina-1 nas células endoteliais, efeito mediado pelo aumento de GMP cíclico e observado com o peptídeo natriurético atrial. O NO pode, também, regular o tono vascular através de interações complexas com hemoglobina proveniente dos glóbulos vermelhos, glutathione e pequenos grupos tióis. A produção de NO é a maior contribuinte do relaxamento dependente do endotélio em grandes artérias isoladas, incluindo as coronárias, artérias mesentéricas, pulmonares e cerebrais. Seu significado *in vivo* é sugerido pelas observações de que os inibidores da eNOS causam vasoconstrição em muitos leitos vasculares e aumento da pressão arterial sistêmica em animais e humanos (DATTILO e MAKHOUL, 1997; ZATZ e BAYLIS, 1998) (Figura 3).



NADPH= Nicotinamida-adenina- dinucleotídeo fosfato; NADP= Nicotinamida-adenina- dinucleotídeo.

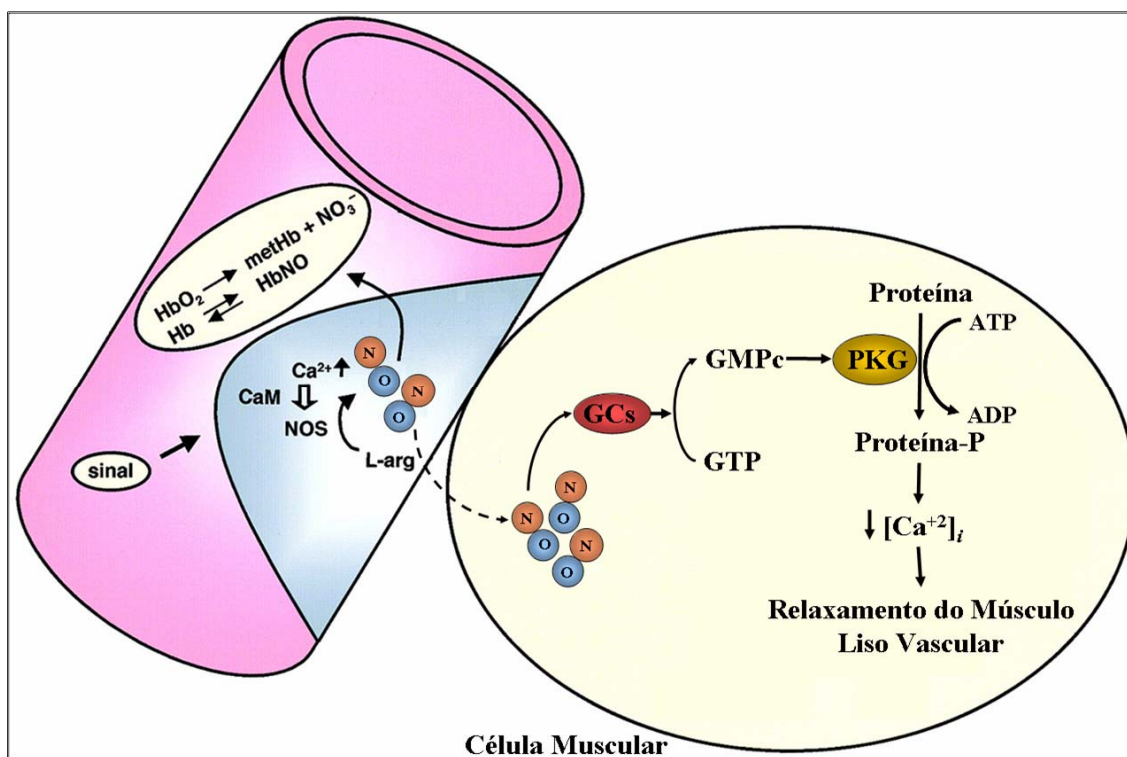
Figura 3- Reação da síntese de óxido nítrico (NO).

A liberação de NO é modulada por estímulos físicos e humorais. Entre os estímulos físicos citam-se: a pressão hidrostática transmural, o estiramento circunferencial e as forças de cisalhamento produzidas pelo atrito da onda de fluxo sanguíneo na parede arterial, considerado, atualmente, um dos principais fatores reguladores da liberação local de NO, indicando que a dilatação induzida pelo fluxo é dependente do endotélio *in vivo* (GIMBRONE *et al.*, 1997; TRAUB e BERK, 1998). As substâncias endógenas que estimulam a liberação de NO são hormônios circulantes, como catecolaminas e vasopressina, autacóides como a bradicinina e a histamina ou ainda, mediadores liberados pelas plaquetas (serotonina e adenosina difosfato - ADP) ou formados durante a coagulação (trombina) (KIELY *et al.*, 1995). A manutenção basal do tono vascular ocorre devido à liberação contínua de NO pelas células endoteliais

(MUNZEL *et al.*, 2003). Alguns hormônios e drogas que alteram os níveis intracelulares de cálcio podem interferir na sua produção e liberação (Figura 4).

O óxido nítrico é sintetizado pelas sintases do óxido nítrico (NOS), isoenzimas presentes em vários tipos de células. Atualmente, dois tipos de NOS foram identificadas: duas formas constitutivas (cNOS) e uma forma induzida por citocinas e outras substâncias (iNOS) (FORSTERMANN *et al.*, 1998). Há dois subtipos de cNOS: uma foi detectada inicialmente no endotélio vascular e é chamada de NOS endotelial (eNOS) (MARSDEN *et al.*, 1993) e a outra se encontra nos sistemas nervoso central e periférico e constitui a NOS neuronal (nNOS) (ELPHICK *et al.*, 1995; MONCADA, 1997; MONCADA e HIGGS, 1995; RODRIGO *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1995).

A nNOS é expressa no cérebro, medula espinhal, gânglios simpáticos, nervos nitrérgicos periféricos, glândulas adrenais (DUNN *et al.*, 1998) células epiteliais do útero, pulmão, estômago, plaquetas e células das ilhotas do pâncreas, dentre outros tecidos (ALDERTON *et al.*, 2001). A iNOS pode ser induzida por lipossacarídeos, toxinas de bactérias e citocinas nos macrófagos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos e células da musculatura lisa vascular (KNOWLES *et al.*, 1990). A eNOS é bastante expressa nas células endoteliais, sendo também expressa em plaquetas, cardiomiócitos e outros tipos celulares (LAMAS *et al.*, 1992). A nNOS, a eNOS, e a iNOS têm sido associadas com neurônios, endotélio e indução, respectivamente. Entretanto, elas também se apresentam em outras localizações. Por exemplo, a eNOS também tem sido localizada em plaquetas e em certas populações de neurônios no cérebro (DINERMAN *et al.*, 1994), e a eNOS, no epitélio dos brônquios e traquéia (KOBZIK *et al.*, 1993).



Ca/CaM= cálcio/calmodulina; HbO₂= oxihemoglobina; metHb= metahemoglobina; NO₃⁻= nitrito;
Hb= hemoglobina; HbNo= nitrohemoglobina; NOS= sintase endotelial do óxido nítrico;
L-arg= L-arginina; GMPc= guanosina monofosfato cíclico; GTP= guanosina trifosfato;
PKG= proteína quinase g; ATP= adenosina trifosfato; ADP= adenosina difosfato.

Figura 4- Mecanismo de sinalização NO/GMPc no sistema vascular. NO é sintetizado no endotélio vascular, através da ação da NOS que é regulada pela formação do complexo Ca/CaM. A difusão do NO para o tecido muscular ativa GCs e uma vez ativado, cataliza a formação de GMPc e cascata de sinalização que resulta em relaxamento do músculo vascular liso (vasodilatação). Modificado de MUNZEL 2003.

Ambas, atividade e quantidade da nNOS e eNOS constitutivas presentes nos tecidos podem variar em decorrência de vários fatores, indicando que a expressão destas formas também podem ser “induzidas”, Por exemplo, gravidez e tratamento com estradiol podem aumentar os RNAs mensageiros para ambos eNOS e nNOS (WEINER *et al.*, 1994).

As forças de cisalhamento *in vitro* e exercícios constantes podem também aumentar a expressão do gene da eNOS no endotélio da aorta.

A eNOS é um dímero que consiste de dois monômeros idênticos de 134 kD. O gene que codifica os monômeros da eNOS está localizado no braço longo do cromossomo 7 na posição q35-36 e contém 26 éxons e 21 kB de extensão (MARSDEN *et al.*, 1993). Os monômeros da eNOS têm dois diferentes domínios, um domínio oxigenase N-terminal (1 a 2291 aminoácidos) que contém o sítio catalítico e um domínio redutase C-terminal (492 a 1205 aminoácidos) (LEBER *et al.*, 1999). O domínio redutase tem sítios de ligação para NADPH, flavinas e calmodulina (CaM), e transfere elétrons via flavinas ao grupo heme ligado ao domínio oxigenase. O domínio oxigenase, o qual tem sítios para ligação da L-arginina e tetrahydrobiopterina, pode ligar o O² e catalisar a segunda etapa da síntese de NO (GHOSH *et al.*, 1995; PALMER *et al.*, 1988).

A eNOS se localiza, no mínimo, em três compartimentos celulares: o complexo de Golgi, a membrana citoplasmática e a cavéola (ANDREW e MAYER, 1999). Estudos também têm demonstrado que a eNOS pode ser detectada no núcleo de células endoteliais e adipócitos. Embora tal localização facilite a interação do NO com fatores de transcrição, seu exato papel e condições associadas a essa localização nuclear permanecem desconhecidos (GIORDANO *et al.*, 2002).

A eNOS é funcional apenas sob a forma dimérica. A dimerização de eNOS se inicia com sua ligação ao heme (KLATT *et al.*, 1996). A estabilização do dímero depende de tetrahydrobiopterina (BH4) (LIST *et al.*, 1997), além de íons zinco, os quais mantêm a integridade dos sítios de ligação BH4 (RAMAN *et al.*, 1998). Os monômeros que compõem os dímeros da eNOS ativos são conjugados com ácido mirístico e palmítico e assim podem associar-se com membranas intracelulares. Essa associação com membranas é necessária para a fosforilação e ativação da eNOS em resposta a estímulos como os fatores de crescimento endotelial vascular (VGF) (HECKER *et al.*, 1994).

A eNOS pode ser fosforilada em resíduos de serina, treonina e tirosina, e embora existam vários sítios de fosforilação, o de maior importância funcional é um resíduo de treonina (Thr 495) no domínio de ligação da CaM e um resíduo de serina

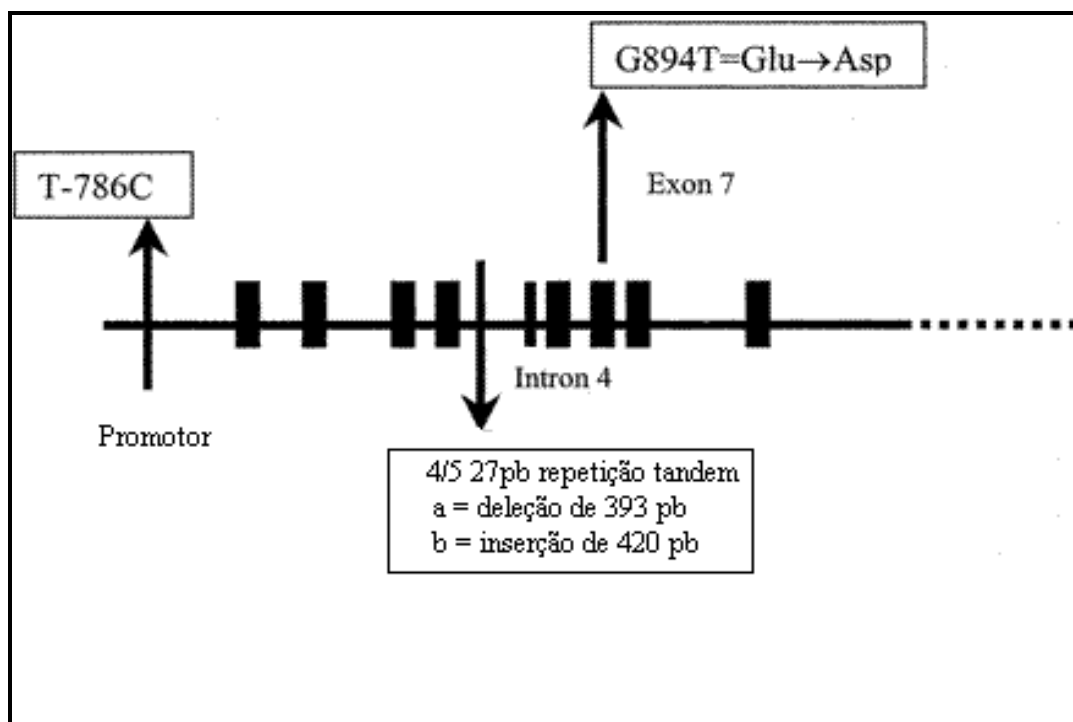
(Ser 1177) no domínio redutase (HIRATA, K. *et al.*, 1995; KIM, F. *et al.*, 2001) . Embora a eNOS seja considerada como uma NOS expressa constitutivamente, vários fatores afetam sua expressão basal e atividade enzimática, como a hipóxia (HOFFMANN *et al.*, 2001), os hormônios como o estrógeno (RUEHLMANN e MANN, 2000), oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL oxidadas) (RAMASAMY *et al.*, 1998), as forças de cisalhamento e as forças mecânicas (UEMATSU *et al.*, 1995). Esses fatores podem induzir a transcrição de eNOS. Por exemplo, por ativar a AP-1 durante a hipóxia, ou podem levar à ativação da eNOS por aumento do cálcio intracelular (HOFFMANN *et al.*, 2001). Neste caso, eNOS pode ser ativada por estímulos independentes de aumento nos níveis de cálcio, sendo as mais importantes as forças de cisalhamento geradas pelo atrito dos elementos da corrente sanguínea na superfície endotelial (GIMBRONE *et al.*, 1997; TRAUB e BERK, 1998). O cisalhamento ativa a fosfatidilinositol 3-kinase e causa subsequente ativação da serina kinase AKt e proteína kinase A (PKA), a qual fosforila a eNOS em serina 1177 e aumenta a atividade da eNOS (KANAI *et al.*, 1995).

A produção de NO endotelial não é exclusivamente dependente da expressão da eNOS, mas é determinada por um complexo de sinalização que consiste da enzima e um conglomerado de proteínas adaptadoras estruturais, kinases, fosfatases e proteínas motoras que afetam sua complexa associação e determinam sua localização intracelular (GARCIA-CARDENA *et al.*, 1997; HINSHAW, 2000).

O gene da eNOS apresenta 13 polimorfismos conhecidos atualmente. Estes polimorfismos estão presentes na região promotora (SNPs nas posições -786, -924 2 -1474) (NAKAYAMA, M. *et al.*, 1999; POIRIER *et al.*, 1999), na região codificadora do DNA (C774T, G894T - [Glu298Asp]) (YOSHIMURA *et al.*, 1998) e 5 nos íntrons 2, 11, 22 e 23 (POIRIER *et al.*, 1999) um *variable number of tandem repeats* (VNTR) de 27 pares de bases no íntron 4 e uma repetição de CA no íntron 13 (MIYAHARA *et al.*, 1994).

Entretanto, três polimorfismos do gene da eNOS têm sido mais amplamente estudados: um SNP da região promotora (T-786C), um SNP no éxon 7 (G894T) e um número variável de bases que se repetem (VNTR) no íntron 4 (MARSDEN *et al.*, 1993).

O polimorfismo Glu298Asp (G894T) é um dos polimorfismos mais estudados da eNOS. Caracteriza-se pela substituição de ácido glutâmico por ácido aspártico no resíduo aminoácido 298 da estrutura protéica da enzima, o que corresponde à substituição de uma guanossina por tirosina na posição 894 do éxon 7 (TESAURO *et al.*, 2000). (Figura 5).



Promotor= T-786C, Éxon 7 G894T Glu → Asp, Íntron 4 repetição de 27 pb em tandem.
Modificado de TESAURO 2000.

Figura 5- Esquema representativo do gene da eNOS, ilustrando os principais polimorfismos descritos.

Sobre possíveis alterações funcionais provocadas pelos variantes do polimorfismo do éxon 7 (Glu298Asp), mesmo após vários estudos, continua incerto se possíveis associações entre este variante e DCV resultam diretamente em um efeito funcional ou é devido ao desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos da eNOS ou outros genes. Alguns trabalhos demonstram semelhança entre GluNOS e AspNOS com

relação a atividade enzimática, localização subcelular ou proteólise (FAIRCHILD *et al.*, 2001; TSUJITA *et al.*, 2001), inclusive nos parâmetros enzimáticos como Km para L-arginina, Vmax, ligação a co-fatores (FAD, FMN, Heme e 4BH) (GOLSER *et al.*, 2003). Apesar de diversos trabalhos demonstrarem *in vitro* ausência de mudanças bioquímicas entre as variantes, *in vivo* a presença destas pode alterar mecanismos de regulação da atividade da eNOS, por exemplo nas cascatas de fosforilação e nas interações proteína-proteína (LANDAR e DARLEY-USMAR, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Por outro lado, estudos de associação entre variantes da eNOS e DCV particularmente HÁ, têm mostrado resultados discrepantes, alguns estudos detectaram associação entre polimorfismos da eNOS e HA em diferentes casuísticas (CHEN *et al.*, 2004; HYNDMAN *et al.*, 2002; JACHYMOVA *et al.*, 2001; JIA *et al.*, 2003; LACOLLEY *et al.*, 1998; LI, R. *et al.*, 2004; MIYAMOTO *et al.*, 1998; NAKAYAMA, T. *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2006; PULKKINEN *et al.*, 2000; RODRIGUEZ-ESPARRAGON *et al.*, 2003; SHOJI *et al.*, 2000; TSUJITA *et al.*, 2001; UWABO *et al.*, 1998) e outros não confirmaram esses achados (BENJAFIELD e MORRIS, 2000; BONNARDEAUX *et al.*, 1995; DEREBECKA *et al.*, 2002; KAJIYAMA *et al.*, 2000; KARVONEN *et al.*, 2002; KATO *et al.*, 1999; KISHIMOTO *et al.*, 2004; LAPU-BULA *et al.*, 2005; NEUGEBAUER *et al.*, 2000; WOLFF *et al.*, 2005). Desta forma, não existe consenso entre os diferentes trabalhos para consolidar um marcador da eNOS associado a HA. As possíveis causas destas discrepâncias provavelmente devem-se: 1) ao baixo poder estatístico destes estudos estreitamente relacionado ao tamanho da amostra; 2) aos critérios de seleção e exclusão como idade, presença de pseudo-hipertensão ou hipertensão do jaleco branco e hipertensão secundária não diagnosticada; 3) por se tratar de uma doença poligênica, o efeito de um gene pode ser mascarado por outro; 4) estratificação populacional ou diversidade étnica (SHIMASAKI *et al.*, 1998; TANUS-SANTOS *et al.*, 2001); 5) foco na contribuição de apenas um polimorfismo par uma condição clínica específica.

6- Sistema Renina - Angiotensina - Aldosterona

O sistema SRAA regula o balanço hidro-eletrolítico e a PA, além de outros subsistemas. O papel do SRAA na fisiopatologia da HA foi estabelecido a partir dos experimentos clássicos de Goldblatt, demonstrando a importância da pressão de perfusão renal na secreção de renina (GOLDBLATT, 1964). A renina é uma enzima proteolítica, sintetizada como pré-pró-renina, que é clivada em pró-renina e, posteriormente, em renina ativa, a qual é armazenada e liberada imediatamente após estímulo. Quando é liberada na circulação, a renina cliva o angiotensinogênio (AGT), formando a angiotensina I (decapeptídeo). O AGT é produzido pelo fígado, que requer glicorticóides do córtex adrenal e estrógeno das gônadas; a renina é liberada pelos rins, enquanto que a enzima de conversão de angiotensina I (AG-I) em angiotensina II (AG-II) (ECA) é encontrada no endotélio vascular de vários órgãos. Estas reações ocorrem no plasma e em vários tecidos como rins, cérebro, adrenais, ovários, músculo liso vascular e células endoteliais. Uma vez ativada a cascata, surgem a AG-I e a AG-II (octapeptídeo), que circulam pelo sangue ativando suas estruturas-alvo: vasos sanguíneos (sobretudo arteríolas e veias sistêmicas), rins, coração, adrenais e o sistema nervoso simpático (CORVOL *et al.*, 1995; DZAU, 1987; GIBBONS, 1998; MORGAN *et al.*, 1996).

A rápida expansão das técnicas de biologia molecular permitiu que os respectivos genes associados aos componentes do SRAA fossem clonados e seqüenciados (OHKUBO *et al.*, 1983), o que possibilitou a determinação da distribuição tecidual de seus componentes. Por isso, diferentemente da visão endócrina clássica, atualmente é aceito SRAA tecidual, com funções parácrinas, autócrinas e epícrinas (JOHNSTON, 1990), tendo-se observado todos ou quase todos os seus componentes em tecidos como coração (DANSER *et al.*, 1999), tecido vascular (SAMANI e SWALES, 1991) e rins (ROHRWASSER *et al.*, 1999).

Há décadas a AG-II é estudada, e acreditava-se que seu efeito fosse mediado por um único receptor; mas, no final dos anos 80, estudos com antagonistas específicos identificaram os subtipos AT1 e AT2 (CAREY *et al.*, 2000). Até o início da década de 90, as ações da angiotensina II eram atribuídas ao receptor AT1, sendo as funções do AT2 pouco conhecidas (ARDAILLOU, 1999). Em 1992, porém, SASAMURA *et al.* clonaram e

caracterizaram duas isoformas do AT1: AT1A e AT1B. Atualmente são reconhecidos vários tipos de receptores AT, envolvidos em ações específicas da AG-II ou das outras angiotensinas (AG-I e AG-III) (SASAMURA *et al.*, 1992). Recentemente, foi demonstrado que os receptores AT1A têm papel essencial no desenvolvimento da hipertensão 2 rins 1 clipe de Goldblatt (CERVENKA *et al.*, 2002). Além disso, sabe-se hoje que as ações dos receptores AT2 funcionalmente se opõem às ações dos receptores AT1 (NAVAR *et al.*, 2002), podendo a própria AG-II agir simultaneamente sobre ambos os receptores, de modo a permitir uma modulação de seus efeitos (ARIMA e ITO, 2001).

Estudos recentes têm ampliado nosso conhecimento sobre eventos celulares mediados pela AG-II, sugerindo, que seu papel biológico é tão amplo que vai do intracelular ao tecido ou ao sistema (TAUBMAN, 2003). As principais ações hemodinâmicas da AG-II são: estimular a reabsorção de sódio; estimular a secreção de aldosterona; a liberação de hormônio antidiurético e citocinas; promover vasoconstrição e aumentar o tônus simpático facilitando a liberação de noradrenalina, potencializando a ação das catecolaminas e reduzindo o ganho de reflexo pressorreceptor. Entre as ações não hemodinâmicas citam-se: aumento da produção de radicais de oxigênio; proteinúria; efeitos metabólicos; pró-trombóticos; estímulo da síntese de colágeno e redução da sua recaptação e degradação; proliferação e hipertrofia vascular e cardíaca.

Além das funções já caracterizadas, a AG-II vem sendo considerada uma citocina multifuncional com propriedades não-hemodinâmicas. Nesse contexto, destacam-se fator de crescimento, citocina pró-fibrinogênica e pró-inflamatória (RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2002) e modulador da resposta imunológica, como quimiotaxia, proliferação e diferenciação de monócitos em macrófagos (THEUER *et al.*, 2002).

As propriedades pró-inflamatórias da AG-II vêm recebendo mais atenção nos últimos anos, e as vias envolvidas nesse processo estão sendo mapeadas. Recentemente determinou-se que a AG-II estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (RAIJ, 2001; ZAFARI *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 2006), que podem servir como sinal para a produção de fatores como fator necrose kappa beta (NF-kB), largamente associado à inflamação (RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2000). Alguns estudos têm confirmado essa hipótese, em que a estimulação de receptores AT1 e AT2 pela AG-II leva ao aumento de NF-kB

e de outros fatores pró-inflamatórios. Enquanto, a angiotensina III atua principalmente via receptores AT₂ (LORENZO *et al.*, 2002). Sabe-se, também, que a AG-II atua no processo de lesão vascular, aumentando a biossíntese de colesterol por macrófagos estando envolvida na fisiopatologia da aterosclerose (OHISHI *et al.*, 1997).

6.1- Angiotensinogênio

O AGT é uma α_2 globulina que circula em quantidades abundantes no plasma. O AGT humano contém 452 aminoácidos e é sintetizado basicamente no fígado, embora o RNAm que codifica a proteína também seja abundante no tecido gorduroso, em determinadas regiões do sistema nervoso central (SNC) e nos rins (CAMPBELL e HABENER, 1986). A síntese do AGT é estimulada por vários hormônios, incluindo glicocorticóides, hormônio tireoideano e pela própria AG-II (BEN-ARI *et al.*, 1989; BRASIER *et al.*, 1986). A concentração plasmática do AGT é reflexo direto da sua síntese, não é estocado nos hepatócitos. Entretanto, é constitutivamente secretada. O AGT sintetizado nos tecidos extra-hepáticos é um importante componente do SRAA extravascular sendo considerado um reservatório para as ações da renina. A concentração plasmática de AGT é de ordem micromolar, enquanto a concentração de renina é 1.000 vezes menor. A Km da renina para clivagem do AGT em AG-I é relativamente alta, e a razão de produção de AG-I por este sistema é provavelmente controlada pela concentração local de AGT, outras proteases teciduais também podem hidrolizar AGT para AG-I ou eventualmente direto para AG-II. Desta forma, a produção local de AG-II por esses sistemas tem efeitos autócrinos e parácrinos, sendo regulados localmente de forma independente.

O gene do AGT contém 1.455 nucleotídeos e codifica para 485 aminoácidos. O gene do AGT contém 5 éxons e 4 íntrons em 13 kb e encontra-se localizado no cromossomo 1 q42-43 humano. Entre os vários polimorfismos do gene para AGT descritos incluem-se no mínimo cinco mutações localizadas no éxon 2, muitas destas são bastante raras detectadas apenas em pró-bandas. Todavia, duas mutações, a T174M que consiste na substituição do aminoácido treonina por metionina na posição 174 da cadeia protéica do

AGT (DAVIS e ROBERTS, 1997) e a descrita por JEUNEMAITRE *et al.* demonstrando que uma variante comum, a substituição de citosina por timina (C→T) no éxon 2, n posição 704 do gene para AGT resultava em síntese de metionina em lugar de treonina na posição 235 da cadeia protéica, estando o alelo 235T associado à HA primária e a níveis mais elevados de AGT (JEUNEMAITRE *et al.*, 1992). (Figura 6).

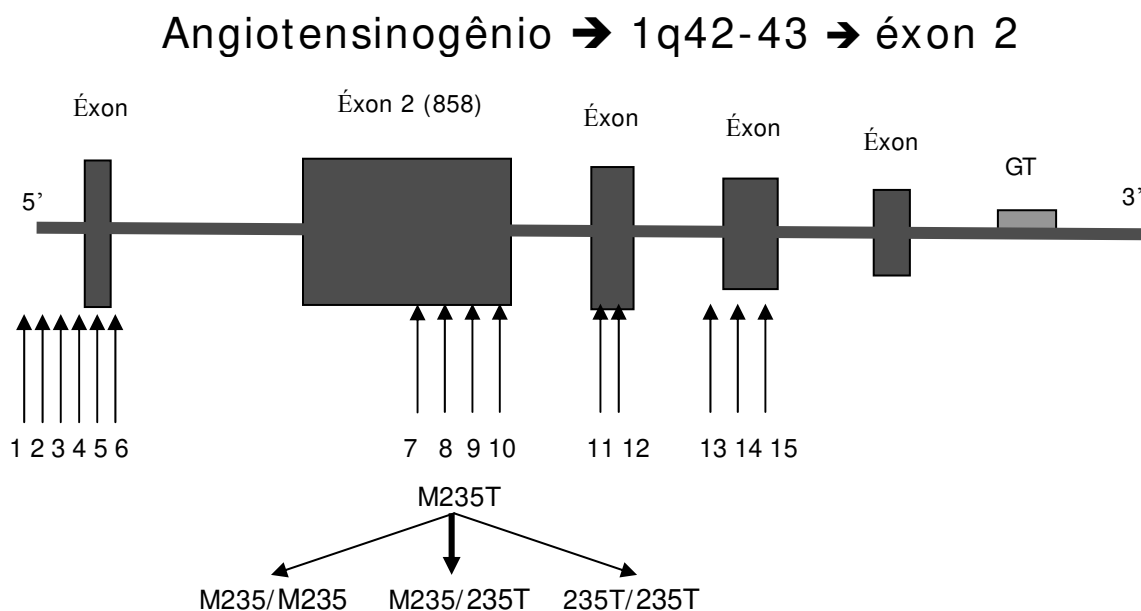


Figura 6- Esquema representativo do gene do angiotensinogênio, ilustrando o polimorfismo M235T no éxon 2. Modificado de JEUNEMAITRE 1992.

Posteriormente, vários estudos publicados com indivíduos hipertensos europeus (BORECKI *et al.*, 1997; CAULFIELD *et al.*, 1994; HEGELE *et al.*, 1994; HEGELE *et al.*, 1996; JEUNEMAITRE *et al.*, 1993; PROCOPCIUC *et al.*, 2002; SCHMIDT *et al.*, 1993; SETHI *et al.*, 2001); japoneses (HATA *et al.*, 1994; HATAE *et al.*, 1994; ISO *et al.*, 2000; IWAI *et al.*, 1995; KAMITANI *et al.*, 1994; NISHIUMA *et al.*, 1995); chineses (NIU *et al.*, 1998; TSAI *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2003); e população de brasileiros confirmaram esta associação (PEREIRA *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2003). Entretanto, outros estudos não confirmaram esta associação

(BARLEY *et al.*, 1994; BERGE e BERG, 1998; BRAND *et al.*, 1998; FORNAGE *et al.*, 1995; HINGORANI *et al.*, 1996; KUNZ *et al.*, 1997; MONDORF *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-PEREZ *et al.*, 2001; ROTIMI *et al.*, 1994; WINKELMANN *et al.*, 1999).

6.2- Enzima conversora da angiotensina I (ECA)

A enzima conversora da angiotensina I (ECA) é uma dipeptidil-carboxilase, descrita inicialmente em 1956 (SKEGGS *et al.*, 1956), considerada posteriormente ser idêntica a cininase II (YANG *et al.*, 1970). A ECA humana contém 1.278 resíduos de aminoácidos e possui dois domínios homólogos, cada um com um local catalítico e com uma região para ligação do ZN^{2+} (SOUBRIER *et al.*, 1993a; SOUBRIER *et al.*, 1993b). Esta enzima é inespecífica e cliva unidades de dipeptídeo de substratos com diferentes seqüências de aminoácidos como o decapeptídeo AG-I e o transforma num potente vasoconstritor a AG-II. Várias outras substâncias podem ser hidrolizadas pela ECA, tais como bradicinina, serotonina, encefalinas, neurotensina e substância P (SKIDGEL, 1985; SKIDGEL e ERDOS, 1985). A ECA pode ser encontrada no plasma bem como no endotélio vascular (CALDWELL *et al.*, 1976; GRUETTER *et al.*, 1988), cérebro, placenta, intestino, túbulos renais (ERDOS e SKIDGEL, 1985) e nos vasos pulmonares (RYAN e RYAN, 1975; RYAN e RYAN, 1977).

Em humanos existem duas isoformas de ECA, codificadas por um único gene localizado no cromossomo 17 na região q23, possui 21 kb e contém 26 éxons e 25 íntrons. A isoforma longa (sECA) é transcrita a partir dos éxons 1-12 e 14-26, enquanto a isoforma curta (gECA) conhecida como germinal ou testicular é transcrita a partir dos éxons 13-26. A região promotora para sECA está localizada na flanco 5' do primeiro éxon, enquanto a região promotora para gECA se localiza dentro do íntron 12. A isoforma sECA humana é expressa nas células endoteliais, especialmente nos capilares pulmonares, assim como nas células epiteliais do rim, intestino delgado e epidídimo. Sua localização sobre a superfície endotelial é ótima para interação com o substrato principal AG-I (RIORDAN, 2003).

Entre os polimorfismos conhecidos do gene para ECA destacam-se o ACE / +4656 rpt, o ACE / T-3892C e um polimorfismo Inserção (I) / Deleção (D) de uma sequência *Alu*, no íntron 16 deste gene. Este polimorfismo foi descrito em 1990 por Rigat e colaboradores (RIGAT *et al.*, 1990). O polimorfismo do tipo I/D do gene para ECA ocorre por inserção de 287 pares de bases na sequência do DNA do íntron 16 do gene da ECA. (Figura 7).

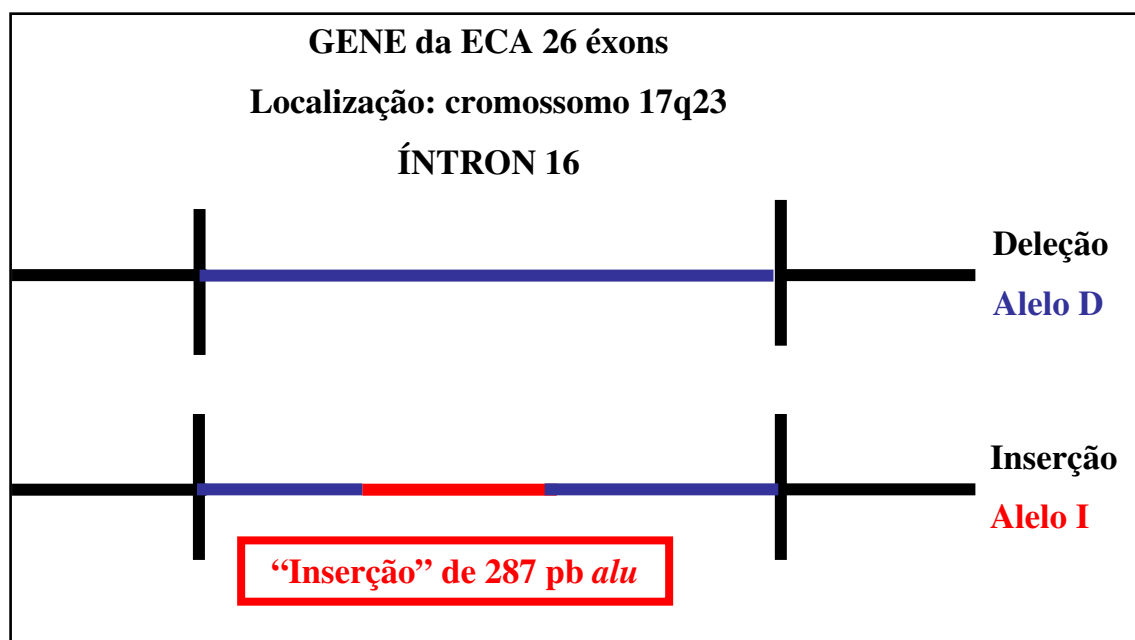


Figura 7- Esquema representativo do gene da enzima conversora da angiotensina I ilustrando o polimorfismo Inserção/Deleção do íntron 16. Modificado de SOUBRIER 1993.

Esses autores foram os primeiros a demonstrar que este polimorfismo era responsável por 47% da variabilidade dos níveis séricos e teciduais da ECA (CAMBIEN *et al.*, 1988; CAMBIEN *et al.*, 1994).

O genótipo DD da ECA está associado com aumento dos níveis plasmáticos da ECA, os quais são geralmente, duas vezes maiores do que os encontrados no homozigoto II, enquanto heterozigotos ID apresentam níveis intermediários. O estudo descrito

inicialmente por Rigat *et al.* (1990) foi amplamente validado por outros autores para ambos os níveis de ECA circulante e tecidual (DANSER *et al.*, 1995; MALIK *et al.*, 1997; TIRET *et al.*, 1992). Todavia, por tratar se de um polimorfismo do íntron o mecanismo de hiper-expressão da ECA em indivíduos com o genótipo DD é incerto. Provavelmente esta relação resulta de uma forte ligação a outro locus envolvido na regulação da expressão do gene da ECA (DAVIS e ROBERTS, 1997).

Estudos de correlação entre o polimorfismo da ECA e DCV são amplamente relatados. Alguns autores apontam associação significativa entre o alelo D e aumento do risco de DAC, incluindo DAC precoce, infarto e morte prematura (CAMBIEN *et al.*, 1994; CAMBIEN *et al.*, 1992). Esta associação foi particularmente significativa no grupo de pacientes de baixo risco, para os quais o risco relativo de infarto agudo do miocárdio atribuível ao genótipo DD foi de 35 % comparado com 8% observado em todo o grupo do estudo ECTIM (*Etude Cas-Temoin e l'Infarctus du Myocarde*). Outros estudos caso-controle confirmaram esses resultados.

Entretanto, estudos de associação entre HA e polimorfismo da ECA são controversos. Ausência de correlação entre níveis plasmáticos da ECA e HA ou entre genótipo DD e hipertensão foram amplamente publicados (BORECKI *et al.*, 1997; GINER *et al.*, 2001; JEUNEMAITRE *et al.*, 1992; SCHMIDT *et al.*, 1993; TURNER *et al.*, 1999). Por outro lado, grandes estudos populacionais, tais como o *Framingham Heart Study*, evidenciaram associação e ligação genética do locus do gene para ECA e HA em homens mais não para mulheres (FORNAGE *et al.*, 1998; O'DONNELL *et al.*, 1998).

Estudos com diferentes grupos étnicos, também mostraram diferenças de distribuição dos genótipos do polimorfismo da ECA apontando para importância da variação étnica na regulação genética da atividade plasmática da ECA e a relação do polimorfismo I/D do gene para ECA e DCV. (BARLEY *et al.*, 1996; BLOEM *et al.*, 1996; DURU *et al.*, 1994; FOY *et al.*, 1996; MATHEW *et al.*, 2001). O estudo de Zee *et al.* mostrou associação positiva entre polimorfismo da ECA e HA, com alta prevalência do alelo I em pacientes hipertensos com história familiar de HA quando comparados a controles normotensos (ZEE *et al.*, 1992).

Em contraste com os numerosos estudos relatando associação positiva entre polimorfismos da ECA e DCV, estudos multicêntricos e de metanálise não confirmaram essa associação (AGERHOLM-LARSEN *et al.*, 1997; AGERHOLM-LARSEN *et al.*, 2000; JEUNEMAITRE *et al.*, 1997; LINDPAINTNER *et al.*, 1995).

7- Vasodilatação Mediada pelo Fluxo

As células endoteliais têm papel importante na homeostase vascular, são 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, similarmente a outros tecidos.

O endotélio possui a capacidade de detectar mudanças das condições fisiológicas, às quais é exposto e responde não somente a fatores humorais circulantes como também a condições mecânicas criadas pelo fluxo sanguíneo. Três forças mecânicas primárias são importantes para a ativação das células endoteliais: 1) a pressão intravascular criada pelas forças de pressão hidrostática dentro do vaso; 2) a tensão circunferencial, criada pelo estiramento das junções intercelulares exercidas sobre as células endoteliais e 3) as forças de cisalhamento, criada durante o contato da coluna sanguínea sobre a superfície endotelial. Esta última, particularmente, é a mais importante, por estimular a liberação de substâncias vasoativas e promover alterações de expressão de genes envolvidos no metabolismo celular e nas alterações morfológicas (DE CATERINA, 2000; GIMBRONE, 1999; GIMBRONE *et al.*, 1997; TRAUB e BERK, 1998). O “cisalhamento” é o mais potente estímulo fisiológico para produção de NO na célula endotelial. Incrementos rápidos e agudos da produção de NO são secundários à ativação pós-traducional da eNOS, enquanto alterações crônicas estão relacionadas a alterações da expressão gênica da eNOS.

A vasodilatação, mediada pelo fluxo (VMF), pode ser induzida através de compressão e descompressão vascular. O aumento de fluxo dessa manobra promove aumento do “cisalhamento” na parede vascular, detectado por mecano-sensores endoteliais que, em artérias normais, levam à produção e à liberação de substâncias vasodilatadoras,

como NO, pelo endotélio. Dessa forma, o aumento de fluxo, pós-descompressão arterial, promove dilatação da artéria em estudo (aumento do diâmetro, por exemplo, artéria braquial, variação esta 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. Em contrapartida, doador de óxido nítrico, como nitroglicerina (NTG), agindo diretamente sobre a musculatura lisa vascular, promove dilatação não-dependente do endotélio.

8- Disfunção endotelial

Quando exposto aos fatores de risco, como HA, o endotélio apresenta alterações funcionais, denominadas genericamente de disfunção endotelial (DE) (BOULANGER, 1999; COOKE e DZAU, 1997; DE ARTINANO e GONZALEZ, 1999; DREXLER, 1997; DREXLER e HORNIG, 1999; MOMBOULI e VANHOUTTE, 1999).

As células endoteliais estão disfuncionantes em várias DCVs e na HA. Usualmente, essa disfunção é expressa como ‘alteração do relaxamento dependente do endotélio’ 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 contribuindo dessa forma, para DE (FERRO e WEBB, 1997). Desta forma, a DE constitui um marcador precoce dessa lesão e é elemento-chave na patogênese das DCVs (BOULANGER, 1999; PANZA, 1997; PANZA *et al.*, 1993; PANZA *et al.*, 1990; TADDEI *et al.*, 2000; VALLANCE *et al.*, 1989; VANE *et al.*, 1990; VANHOUTTE, 1996).

A avaliação não invasiva da função endotelial, por meio de ultra-som (U-S) de alta resolução e do estudo do fluxo arterial, vem sendo utilizada, ultimamente, com bastante acurácia e reprodutibilidade (CELERMAJER *et al.*, 1994a; CELERMAJER *et al.*, 1993; CELERMAJER *et al.*, 1992; CELERMAJER *et al.*, 1994b; SORENSEN *et al.*, 1995). Ela pode ser realizada antes e após qualquer intervenção física ou farmacológica,

permitindo a demonstração das alterações e dos efeitos da exposição a fatores de risco para DCV. Sobretudo, há ainda excelente correlação hemodinâmica e laboratorial, como relatam os trabalhos citados anteriormente de Celermajer e colaboradores e de outros grupos (ANDERSON *et al.*, 1995; IYYAMA *et al.*, 1996; JOANNIDES *et al.*, 1995; LI, J. *et al.*, 1997; YUGAR-TOLEDO *et al.*, 2005a; YUGAR-TOLEDO *et al.*, 2004).

Uma importante consequência da DE é a inabilidade de liberação dos fatores de relaxamento derivados do endotélio. A DE pode ser avaliada de forma não invasiva, quantificando-se a resposta da artéria braquial ao estímulo mecânico como a resposta à manobra de compressão/descompressão da artéria braquial (aumento do fluxo provocado por vasodilatação dependente do endotélio), ou após estímulo farmacológico de substâncias vasodilatadoras, como a nitroglicerina, cuja ação é direta sobre a musculatura lisa vascular. Através do uso do U-S de alta resolução, o grau da disfunção é expresso em diferença percentual de acréscimo do diâmetro, comparando-se os valores obtidos em repouso, durante a primeira amostragem, com o registrado pós-estímulo mecânico e ou farmacológico (ADAMS *et al.*, 1998; JOANNIDES *et al.*, 1995).

9- Avaliação da massa de ventrículo esquerdo

Entre as muitas adaptações sofridas pelo organismo para suportar a sobrecarga crônica de pressão encontra-se a hipertrofia ventricular esquerda (HVE). Essa adaptação está associada a maior morbidade e mortalidade dos seus portadores. É possível que o mecanismo adaptativo esteja acompanhado de alterações intrínsecas dos miócitos cardíacos ou de outras células miocárdicas, predispondo a um déficit contrátil e instabilidade elétrica do coração. Com relação ao aumento da massa do VE, os resultados do *Framingham Heart Study* demonstraram de forma inequívoca o valor prognóstico da detecção de hipertrofia ventricular esquerda na estratificação de risco para doença cardiovascular, morbidade e mortalidade (LEVY *et al.*, 1992).

10- Avaliação da Espessura Íntima - Média das Carótidas

A avaliação da espessura íntima - média (EIM) das paredes anterior e posterior da carótida, utilizando U-S de alta resolução, um método seguro, preciso, reprodutível de baixo custo e amplamente disponível, vem sendo usado na detecção precoce de remodelamento vascular e como marcador precoce de aterosclerose. Desde os primeiros trabalhos descritos por PIGNOLI *et al.* em 1986 (PIGNOLI e LONGO, 1986; PIGNOLI *et al.*, 1986) vários estudos populacionais e casos-controle (BALDASSARRE *et al.*, 2000a; BALDASSARRE *et al.*, 2000b; BOTS *et al.*, 1997; BURKE *et al.*, 1995; LONN *et al.*, 2001; NEUNTEUFL e MAURER, 2003; O'LEARY *et al.*, 1999; RILEY *et al.*, 1992a; RILEY *et al.*, 1992b; SUN *et al.*, 2000; YUGAR-TOLEDO *et al.*, 2005a; YUGAR-TOLEDO *et al.*, 2005b) têm demonstrado excelente segurança, confiabilidade, acurácia e reprodutibilidade. Na prática clínica, a avaliação da EIM das carótidas não é realizada de rotina, porém sua aplicabilidade em estudos de prevenção primária e estratificação de risco cardiovascular encontram-se plenamente estabelecidos.

A EIM é definida como a distância entre a interface lúmen - íntima e a interface média - adventícia. A mensuração da EIM é realizada utilizando U-S de alta resolução com transdutor linear de 7,5 a 12 MHz e protocolo de aquisição de imagens no segmento distal da carótida comum, estando padronizada a mensuração no mínimo de 100 pontos ou de uma extensão mínima de 1,0 cm da artéria em sentido longitudinal excluindo o bulbo carotídeo (LONN, 2001; SIMON, A. *et al.*, 2002). O método de escolha de mensuração das imagens obtidas é o automatizado usando-se programa de análise baseado na densidade da escala de cinza e um algoritmo específico de reconhecimento tissular, que permite uma mensuração automática sem dependência do leitor.

11- Hipótese

Mecanismos herdados geneticamente contribuem de forma decisiva para o desenvolvimento de HAR.

Polimorfismos dos genes do AGT e da ECA do SRAA e da eNOS seriam responsáveis pela predisposição individual à HAR.

Alterações funcionais do endotélio vascular arterial presentes na HAR como causa ou consequência estariam envolvidas e determinariam a manutenção do quadro clínico e podem se associar com variantes genéticas.

Fenótipos intermediários participam da fisiopatologia da HAR.

Capa objetivos

Este trabalho tem como objetivos:

- Caracterizar e analisar comparativamente perfil clínico, demográfico, antropométrico e bioquímico de pacientes com HAR, HT e controles.
- Avaliar a massa do ventrículo esquerdo, a espessura íntima - média das carótidas e quantificar a reatividade vascular, visando identificar alterações morfológicas funcionais cardiovasculares.
- Analisar marcadores genéticos (SNP) dos genes do AGT, da ECA e da eNOS, visando esclarecer mecanismos básicos de controle da PA, incluindo a identificação de predisposição individual à HAR.
- Avaliar a associação dos polimorfismos da AGT, ECA e eNOS, com as alterações morfológicas e funcionais cardiovasculares.

Capa casuística e metodos

1- Casuística

1.1- Características dos pacientes

Foram avaliados 220 indivíduos, dos quais 70 eram pacientes portadores de HAR que preencheram os requisitos de inclusão no estudo, 80 indivíduos eram hipertensos moderados e responsivos a tratamento farmacológico. Os demais indivíduos ($N = 70$) constituíram o grupo controle. O tamanho da amostra foi estimado com base em um poder de teste de 80% de se demonstrar os objetivos do estudo através de regressão logística sob risco alfa de 5% bilateral. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP em 22 de janeiro de 2002 (PARECER PROJETO Nº 315/2001) (Anexo 1).

1.2- Seleção e acompanhamento clínico dos pacientes

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

Grupo- Hipertensão arterial refratária (HAR): critérios estabelecidos pelo JNC VII - USA (CHOBANIAN *et al.*, 2003); IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, (2004). $PA > 140/90$ na vigência do uso de 3 ou mais fármacos anti-hipertensivos, sendo um deles obrigatoriamente um diurético em dose plena e os outros em doses terapêuticas preconizadas.

Grupo- Hipertensão Arterial Moderada Responsiva (HT): critérios estabelecidos pelo JNC VII - USA (CHOBANIAN *et al.*, 2003); IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, (2004). $PA \leq 135/85$ mmHg em indivíduos hipertensos com boa resposta terapêutica a terapia não farmacológica e farmacológica convencional.

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

A idade do grupo HAR variou de 29 a 65 anos (média= $50,0 \pm 9,1$ anos), no grupo HT de 18 a 64 anos (média= $52,2 \pm 11,1$ anos) e no grupo CT de 18 a 65 anos (média $44,2 \pm 13,8$ anos). No grupo HAR 44% dos pacientes eram do sexo masculino e 56% do sexo feminino, entre os do grupo HT 29% e 71% e no grupo CT 36% e 64 %, respectivamente.

Todos os pacientes foram acompanhados clinicamente por especialistas e receberam tratamento para suas afecções de acordo com os padrões e normas clínicas vigentes. Para cada paciente foi preenchido um formulário (Anexo 2) e somente incluído o paciente que aceitara as condições do termo de consentimento informado (Anexo 3).

1.2.1- Critérios de inclusão

Os critérios para inclusão no estudo foram: ter diagnóstico de hipertensão arterial refratária - pressão $> 140/90$ mmHg de acordo com protocolo padronizado de diagnóstico de HAR e exclusão das causas de pseudo-refratariedade, não adesão ao tratamento farmacológico e não farmacológico, HA secundária, co-morbidades e doenças associadas; ou ter HA controlada; possuir idade entre 21 a 65 anos; não apresentar doenças associadas; estar com consultas médicas programadas de forma habitual; ser capaz de compreender, verbalizar e responder questões; concordar em participar do estudo; assinar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido; estar em seguimento na Unidade há pelo menos, seis meses.

1.2.2- Critérios de exclusão

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

2- Métodos

2.1- Coleta de dados clínicos

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

2.2- Medida da pressão arterial

A base necessária para avaliação da HA é a acurácia da mensuração da PA. Foi utilizado um esfigmomanômetro devidamente calibrado e aferido, com manguito de tamanho apropriado para a circunferência braquial em estudo. O ambiente calmo e as mensurações foram precedidas de um período de relaxamento de 5 a 15 minutos, e no mínimo de 60 minutos após ingestão de café ou 30 minutos após consumo de cigarro, uma vez que os principais componentes químicos de ambos (caféina e nicotina) elevam a pressão arterial. O paciente teve de permanecer sentado confortavelmente com o braço apoiado num suporte, mantendo o mesmo à altura do ápex, ou deitado em decúbito dorsal horizontal, sendo necessárias, no mínimo, duas medidas em cada braço com intervalos regulares para maior acurácia do método (BEEVERS *et al.*, 2001); IV Diretrizes SBH, (2004).

Com relação, à medida da PA residencial, foi recomendado aos pacientes, que ela fosse realizada no Posto de Saúde mais próximo de sua moradia, pelo menos duas vezes por semana e anotada no Cartão de registro da PA.

A monitorização ambulatorial da PA (MAPA) também foi realizada obedecendo as recomendações das III Diretrizes para uso da MAPA (GUIMARAES *et al.*, 2003). Todos os indivíduos foram submetidos a MAPA por um período de 24 h,

pelo processo oscilométrico, utilizando o equipamento Spacelabs (USA) modelo nº 90207. Assim foram obtidas a PA de 24 horas, de vigília, de sono, a PA média e a pressão de pulso.

2.3- Estudo da adesão

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

2.3.1- Determinação da adesão ao tratamento pelo método contagem de comprimidos

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

- 1) A utilizada por Taylor e colaboradores (TAYLOR *et al.*, 1978); e Rand (RAND, 1993) que define adesão como à razão entre o número de “doses” prescritas tomadas pelo paciente e o número de “doses” prescritas para o paciente, podendo ser expressa em percentual, como demonstrado abaixo:

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

2) Contagem de comprimidos (MATSUI *et al.*, 1994), na qual a adesão é definida com base na discrepância entre o número de comprimidos restantes do tratamento prescrito e aqueles que deveriam ter sido utilizados, e pode ser expressa pela fórmula adaptada dos referidos autores, como:

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

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

2.4- Avaliação laboratorial

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

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

Os exames laboratoriais solicitados foram: glicemia de jejum, insulina basal, hemograma completo, hemoglobina glicosilada A1c, sódio e potássio sérico, sódio e potássio urinário, alanina transferase, aspartato transferase, gama glutaril-transferase, fosfatase alcalina, ácido úrico, cortisol plasmático, colesterol total, fração de colesterol de

lipoproteína de baixa densidade (LDLc), fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDLc), triglicérides (TG), uréia, creatinina, *clearance* de creatinina, atividade da renina plasmática, concentração sérica da aldosterona, ácido vanil mandélico, proteinúria de 24 horas, hormônio estimulante da tireóide (TSH), tiroxina livre (T4 livre) e urina tipo I.

2.5- Eletrocardiograma e ecocardiograma

O eletrocardiograma (ECG) e o exame ecocardiográfico foram realizados nos três grupos. A massa do ventrículo esquerdo (MVE) foi calculada pela fórmula de Devereux modificada (DEVEREUX *et al.*, 1986): $MVE = 0,8 [1,04 (SIVD + DDVE + PPVED)^3 - (DDVE)^3] + 0,6$. SIVD e PPVED que representam, respectivamente, medidas da espessura do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo e, DDVE o diâmetro ventricular esquerdo na diástole. Foi realizado o cálculo do índice de massa ventricular (IMV) dividindo a MVE pela SC e também, o cálculo da relação volume massa de ventrículo esquerdo dividindo a MVE pelo DDVE. Os valores expressos em grama (g), grama/superfície corpórea (g/SC) e volume/massa (V/M), respectivamente.

2.6- Avaliação da espessura íntima - média das carótidas

Foi realizada a avaliação da espessura íntima - média das paredes anterior e posterior da carótida, utilizando ultra-som de alta resolução. Este método encontra-se estabelecido e padronizado de acordo com o relatório do “34^o Bethesda Conference Task Force # 3 Noninvasive Atherosclerosis Measurement” (REDBERG *et al.*, 2003).

A luminosidade da sala foi controlada, com temperatura ajustada em 24°C. Para realização do exame o paciente foi posicionado em decúbito dorsal, com a cabeça flexionada levemente voltada para o lado oposta ao examinado. Em geral retiram-se almofadas ou travesseiros. A imagem foi posicionada na tela, de forma que a porção cefálica seja demonstrada à esquerda. Tomando-se o cuidado de não comprimir

exageradamente os tecidos com o transdutor: as estruturas venosas anteriores a carótida não foram colabadas. A interface lúmen - íntima e a interface média - adventícia foram nitidamente definidas tomando cuidado com a utilização correta do controle de ganho, correção de ângulo e inclinação da caixa de amostragem e da sua amplificação.

Utilizou-se aparelho de U-S Toshiba “*PowerVision 6000*” e transdutor vascular linear de alta resolução, frequência de 7-10 MHz, (Tóquio - Japão), acoplado a microcomputador para mensuração automática da EIM. O protocolo de aquisição de imagens no segmento distal da carótida comum foi padronizado para mensuração no mínimo de 100 pontos ou de uma extensão mínima de 1,0 cm da artéria em sentido longitudinal excluindo o bulbo carotídeo (LONN *et al.*, 2001; SIMON *et al.*, 2002).

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

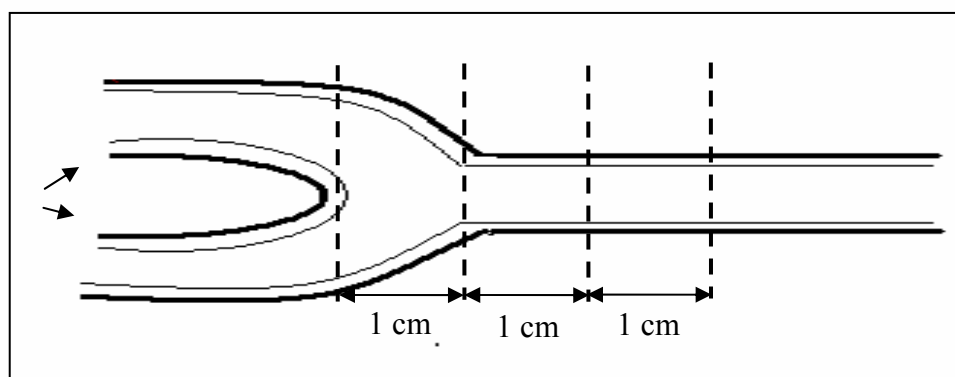


Figura 8- Esquema representativo do método de avaliação da espessura íntima - média (EIM) da carótida comum com ultra-som de alta resolução e transdutor de 7,5-12 MHz. Adaptado de LONN (2001).

2.7- Avaliação Funcional do Endotélio Vascular

2.7.1- Vasodilatação mediada pelo fluxo (VMF)

A avaliação funcional do endotélio vascular, em artérias de médio calibre (artéria braquial) foi realizada utilizando-se a técnica do U-S de alta resolução, mediante aplicação do teste de compressão/descompressão (oclusão por cinco minutos) da artéria braquial para avaliação da função dependente do endotélio e após administração de doador de óxido nítrico como a nitroglicerina sublingual (avaliação da função não dependente do endotélio - reatividade do músculo liso vascular). Este método encontra-se estabelecido e padronizado de acordo com o relatório do “*International Brachial Artery Reactivity Task Force*” *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent vasodilation of the brachial artery* (CORRETTI *et al.*, 2002).

Todos os pacientes hipertensos refratários, os hipertensos controlados e os voluntários normotensos foram submetidos à pesquisa da reatividade vascular dependente do endotélio de forma não invasiva, com U-S *Doppler* de alta resolução. Os pacientes foram informados previamente sobre algumas condições que poderiam afetar os resultados dos exames e solicitados a observá-las. As mulheres foram estudadas entre o segundo e sétimo dia do ciclo menstrual, quando os níveis de estrógenos são mais baixos afetando menos a função endotelial. Os pacientes deveriam estar em jejum de 12 h, sem fumar nesse período, sem fazer uso de café e vitamina C na véspera do exame e sem terem realizado exercício físico prévio na véspera. Medicamentos suscetíveis de alterarem a função endotelial como ácido acetil salicílico foi interrompida 15 dias antes do estudo. As estatinas foram suspensas em média quatro semanas antes da realização do procedimento. A medicação anti-hipertensiva não foi suspensa.

A luminosidade da sala foi controlada, com temperatura ajustada em 24°C. Para realização do exame o paciente permaneceu em posição supina por 15 minutos antes e até o final do mesmo.

Utilizou-se aparelho de U-S Toshiba “*PowerVision 600*” e transdutor vascular linear de alta resolução, frequência de 7-10 MHz, (Tóquio - Japão), acoplado a microcomputador para estudo dinâmico da função vascular. Todas as imagens digitalizadas

foram armazenadas em disco compacto para análise posterior, por dois observadores independentes. A variabilidade entre as medidas do diâmetro arterial deveria ser menor que 2% e de 1% intra-observador, o que realmente ocorreu.

O diâmetro da artéria braquial foi medido quatro vezes consecutivas usando o software de análise off-line de função vascular (M'ATh - Metris-France). As medidas foram tomadas a partir da interface lúmen/parede arterial, no sentido: parede anterior para posterior no final da diástole. O diâmetro médio foi calculado a partir de quatro ciclos cardíacos incidentes com a onda R do ECG. As mudanças do diâmetro da artéria braquial (em percentagem) foram comparadas ao primeiro diâmetro basal (100%) de acordo com a fórmula:

$$\text{VMF} = \frac{(\text{Diâmetro após decompressão} - \text{Diâmetro basal}) \times 10}{\text{Diâmetro basal}}$$

Antes do início da primeira mensuração, o participante teve de permanecer em repouso absoluto, deitado em decúbito dorsal horizontal, comodamente instalado por um período de 15 minutos. A seguir, foi realizado o corte ultra-sonográfico longitudinal da artéria braquial, aproximadamente 5 a 15 cm acima do cotovelo até obter-se uma imagem nítida da artéria braquial em corte longitudinal. O quadro central da artéria foi identificado claramente e as camadas íntima anterior e posterior bem delimitadas, a zona de transmissão ou zona focal foi ajustada para a profundidade desejada.

Nos casos de grande dificuldade, a zona de transmissão focal foi modificada, visualizando-se a parede proximal o mais nitidamente possível. Para avaliação da parede distal, foram aumentados os ganhos em profundidade, evidenciando-se a linha “m” (interface média - adventícia). Após apuração da imagem e da interface lúmen/parede arterial amplificada, os parâmetros de operação da máquina, uma vez regulados, não foram mais alterados durante todo o exame.

Quando uma posição satisfatória do transdutor foi obtida, o suporte auto-estático do transdutor, criado para este estudo foi fixado adequadamente ao braço do paciente permanecendo na mesma posição durante todo o estudo, apoiado numa braçadeira confortável e especialmente desenhada para esta finalidade.

O estudo foi iniciado com a mensuração, em repouso, do diâmetro da artéria braquial. A seguir, as curvas espectrais das velocidades de fluxo obtidas com “Doppler pulsado” (pw) foram obtidas com o cursor do sinal posicionado a um ângulo de 60 graus em relação à parede arterial e a amostra-volume de 1,5 cm direcionada à região central da luz do vaso para obtenção do traçado espectral. Posteriormente, o estímulo mecânico foi provocado pela aplicação de um torniquete com *cuff* braquial de poliuretano (Hokanson, Inc., Bellevue, WA - USA) no braço e insuflado até atingir 250-300 mmHg, permanecendo nesta situação durante 5 minutos, a seguir desinsuflado, promovendo a dilatação dependente do endotélio mediada pelo fluxo (VMF).

A segunda mensuração foi iniciada após liberação do torniquete. Inicialmente o traçado espectral do “Doppler” foi registrado nos primeiros 15 segundos e, logo após, realizada a mensuração do diâmetro da artéria braquial entre 60 e 120 segundos após a desinsuflação do *cuff* e calculada a variação percentual do diâmetro da artéria braquial (SINOWAY *et al.*, 1989). Após descanso de 15 minutos para permitir a recuperação vascular, foi realizada a terceira mensuração, denominada fase de recuperação, com a técnica e os parâmetros de avaliação descritos acima.

Finalmente, foi realizada a estimulação farmacológica com nitroglicerina (doador de óxido nítrico) vasodilatador, que, atuando diretamente na musculatura lisa vascular, provoca dilatação arterial não-dependente do endotélio. A última mensuração foi realizada 4 minutos após a administração de nitroglicerina sublingual (Nitrostat, Parke-Davis, Morris-Plains, NJ, USA). Protocolo de mensuração (Figura 9).

Dessa forma, a nitroglicerina foi utilizada na dose 0,4 mg por via sublingual em única tomada, eventual efeito colateral de menor gravidade como cefaléia e hipotensão arterial foi monitorizado após a administração da droga e o paciente liberado somente após verificação da PA e da condição clínica pós-estudo (Figura 10).

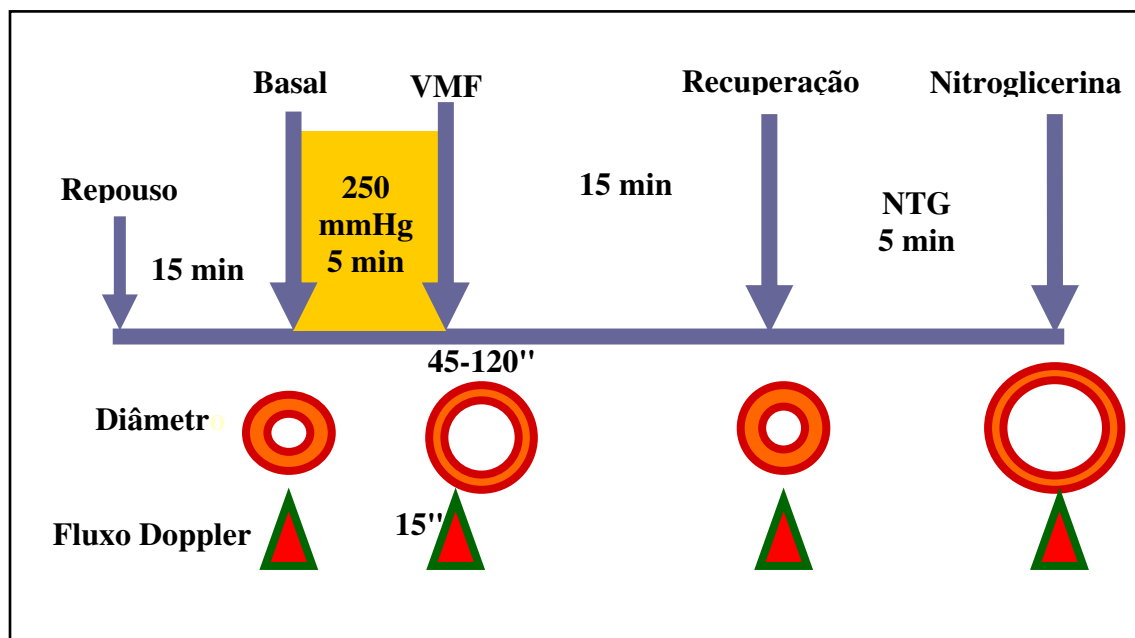


Figura 9- Protocolo de avaliação da vasodilatação mediada pelo fluxo (VMF) da artéria braquial com ultra-som de alta resolução. Adaptado de Celermajer 1992.

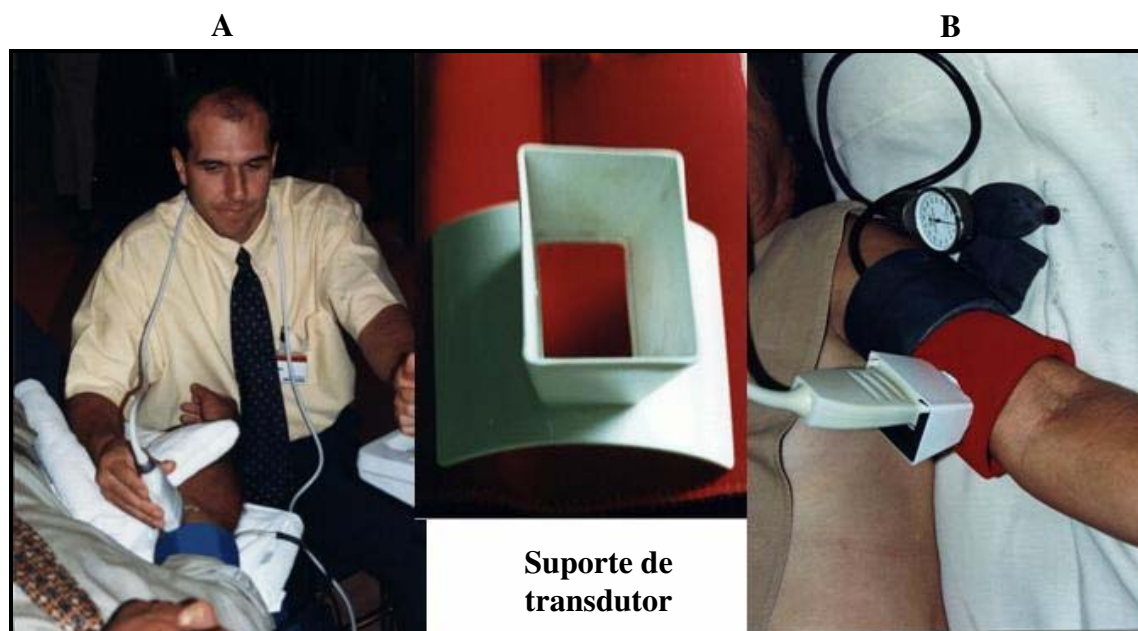


Figura 10- Técnica de mensuração da reatividade vascular da artéria braquial. **A)** Método padronizado por Celermajer *et al.* **B)** Técnica modificada com uso de suporte de transdutor.

2.8- Avaliação dos polimorfismos genéticos

2.8.1- Extração do DNA de leucócitos de sangue periférico

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos de sangue periférico (5mL) coletado com EDTA. A extração foi realizada em três etapas, de acordo com a técnica descrita por Gustincich e modificada por Salazar (GUSTINCICH *et al.*, 1991; SALAZAR *et al.*, 1998), compreendendo:

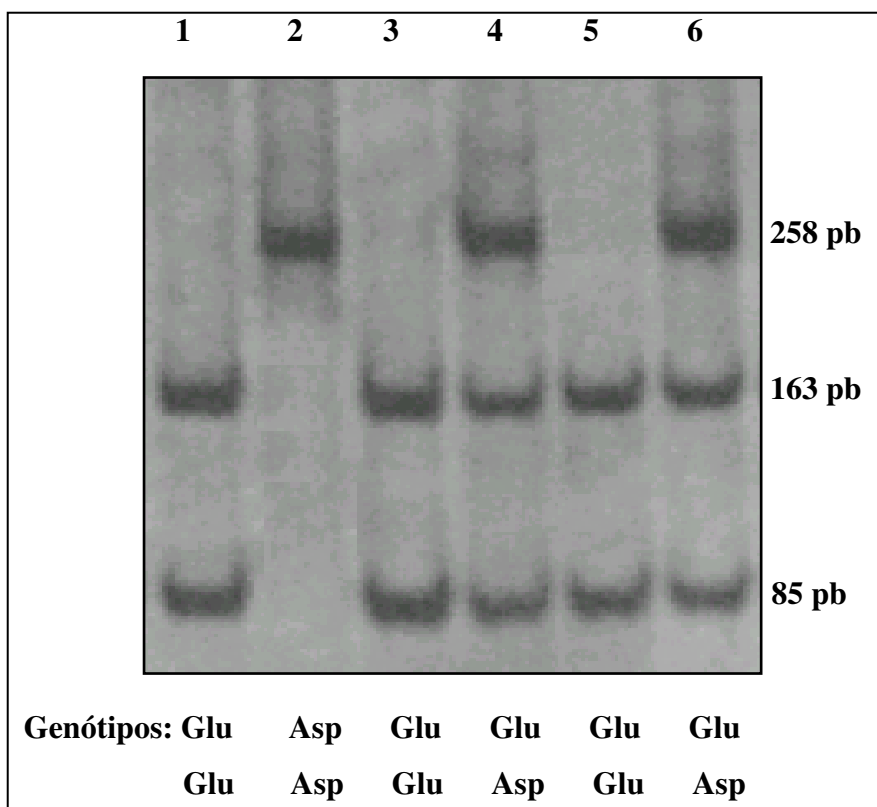
- 1) lise das células sangüíneas e desnaturação. As amostras de sangue foram submetidas a lise celular com 1000 µL de Tampão Tris-1 (Tris-HCl 10 mM pH=8,0, KCl 10 mM, MgCl₂, EDTA 2mM pH=8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220 µL de Tampão Tris-2 (Tris-HCl 10 mM pH=8,0, KCl 10 mM, MgCl₂, EDTA 2mM pH=8,0, Na Cl 0,4 mM) contendo SDS a 1%.
- 2) Desproteinização, as proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µL de Na Cl 5M.
- 3) Precipitação do DNA e resuspensão. O DNA presente no sobrenadante foi purificado por precipitação com etanol absoluto, lavado com etanol a 70% e finalmente dissolvido em 50 µL do Tampão TE (Tris-HCl 10 mM e 1 mM EDTA, pH=8,0) e mantido a -4°C.

A integridade das amostras foi avaliada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo 1,5%. A quantificação e análise da pureza das amostras de DNA foram realizadas por espectrofotometria.

2.8.2- Análise do polimorfismo Glu298Asp do gene para eNOS

Os genótipos do polimorfismo Glu298Asp no éxon 7 foram determinados através da amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os oligonucleotídeos iniciadores (primers) 5'- AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGG A - 3'(sense) e 5'- CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA - 3'(antisense). A reação de PCR foi realizada com um volume de mistura de 25 µL que incluiu aproximadamente 100 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada primer, 200 µM de dNTP, 2.5 mmol/L MgCl₂, 2.5 µl de Tampão 10X PCR e 5U da Taq Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI).

As misturas da reação de PCR foram aquecidas à 94°C por 4 min para desnaturação e submetidas a 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos para desnaturação, a seguir, a 65°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 1 min para extensão. Finalmente, a extensão foi conduzida a 72°C por 5 min. Esta reação resultou em fragmentos de 258 bp que foram digeridos com a enzima Ban II por 6 horas, a 37°C, produzindo fragmentos de 163 bp e 85 bp (variante mais comum - Glu Glu) ou nenhuma digestão (variante mais rara - Asp Asp). As amostras amplificadas foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%, seguida de coloração por nitrato de prata (0,2%). Os indivíduos foram classificados de acordo com o genótipo em: Glu/Glu, Glu/Asp, Asp/Asp (Figura 11).



pb= pares de bases; Glu= glutamato; Asp= aspartato

Figura 11- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% após coloração com nitrato de prata (0,2%). As bandas visualizadas nas colunas 1, 3 e 5 caracterizam o genótipo Glu-Glu, na coluna 2 o genótipo Asp-Asp e nas colunas 4 e 6 o genótipo Glu-Asp.

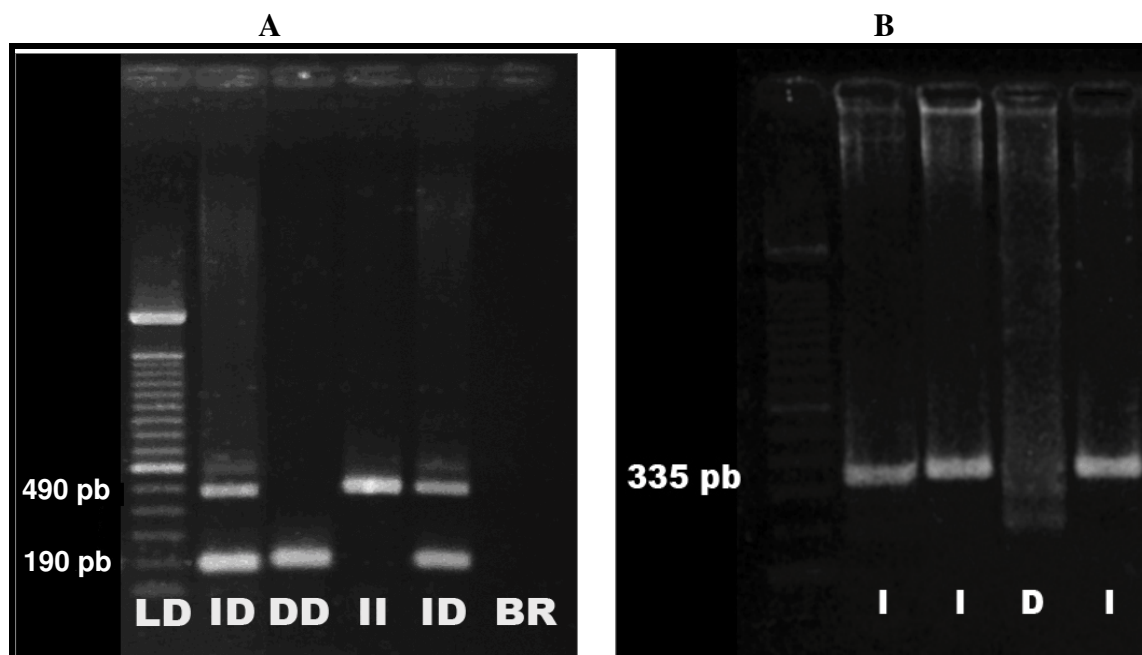
2.8.3- Análise do polimorfismo Inserção/Deleção da enzima conversora da angiotensina I

O polimorfismo I/D do gene para ECA foi determinado através da amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando três nucleotídeos iniciadores (*primers*) com o objetivo de minimizar erros de avaliação que podem ocorrer quando apenas dois nucleotídeos iniciadores são utilizados.

A solução para PCR foi composta de 0,5μL de cada desoxinucleotídeo (0,8mM); 2,5μL de tampão para PCR 10X; 2,5μL de dimetilsulfóxido 10%; 0,75μL de cloreto de magnésio 0,5mM; 2,5μL de cada *primer*: P1 e P2 ou P3 e P4 (2,5mM); 0,2μL de *Taq* polimerase (5U/μL); 7μL de água Milli Q; 5μL de DNA genômico diluído (0,2μg). Para o estudo do polimorfismo genético da ECA foram utilizados os *primers*: P1 - 5'CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT3'; P2 - 5'GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T3'; P3 - 5'TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC3'; P4 - 5'TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA3'. A amplificação do fragmento polimórfico utilizando os *primers* P1 e P2 foi obtida por PCR em 30 ciclos de 94°C por 1 minuto; 58°C por 1 minuto; 72°C por 1,5 minutos e 72°C nos últimos 10 minutos. Os *primers* P3 e P4 foram utilizados em reações para amplificação com 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 69°C por 45 segundos; 72°C por 2 minutos e 72°C nos últimos 7 minutos.

Os produtos de amplificação com os *primers* P1 e P2 foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. Os produtos de PCR com os *primers* P3 e P4 foram aplicados em gel de agarose a 1,8%. O sistema eletroforético foi mantido por cerca de 45 minutos sob corrente contínua de 110 v, utilizando como tampão TAE (Ácido Acético 0,89M; TRIS base 0,89M; EDTA de sódio 0,025M) diluído 60 vezes, acrescido de um corante de 30% de glicerol; 0,05% xileno cianol e 0,05% azul de bromofenol. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,2mg/L) por 10 minutos e os fragmentos de DNA visibilizados sob iluminação ultravioleta. A análise dos genótipos correspondentes ao número de pares de bases (pb) caracterizou DD com 190pb; ID com 490pb e 190pb; II com 490 pb (Figura 12a).

As amostras com os *primers* P3 e P4 foram utilizadas para confirmação do genótipo ID. O alelo D em heterozigotos (ID) é preferencialmente amplificado, o que gera falsa leitura em 4 a 5% das amostras, classificando-se genótipos ID como DD. Nesse caso, o reconhecimento de uma sequência específica da forma polimórfica Inserção implica em um fragmento com 335pb (Figura 12b) Os indivíduos foram classificados de acordo com o genótipo em: D/D, I/D, I/I.



LD= ladder; pb= pares de bases; BR= branco

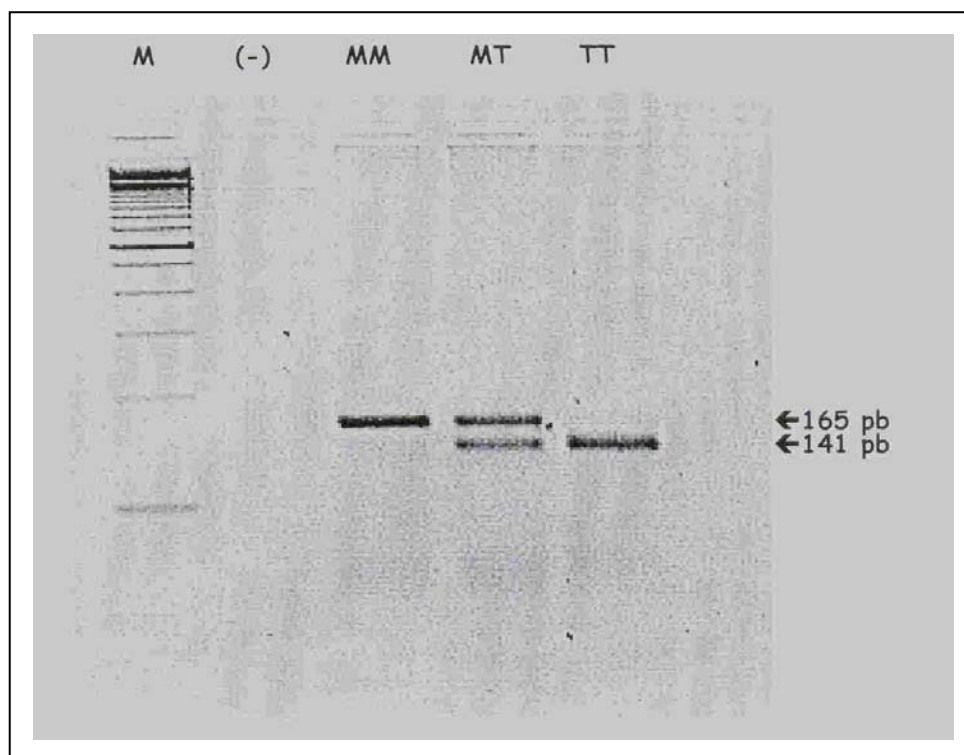
Figura 12- Foto mostrando padrão de banda eletroforética no polimorfismo do gene para enzima conversora da angiotensina (ECA): **A)** com seus dois alelos D com 190 pb, I com 490 pb e três genótipos (DD, ID e II). **B)** banda eletroforética I, com 335 pb.

2.8.4- Análise do polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio

Os segmentos polimórficos dos genes para AGT foram amplificados pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*). A mistura para PCR foi composta de 0,5μL de cada desoxinucleotídeo (0,8mM); 2,5μL de tampão PCR 10X; 2,5μL de dimetilsulfóxido 10%; 2,5μL de cada *primer* (2,5mM); 0,2μL de Taq polimerase (5U/μL); 11μL de água Milli Q e 2μL de DNA genômico diluído (0,2μg). Na reação do AGT utilizou-se para 100 reações: 150μL de 10X Buffer; 10μL de enzima (1U por reação); 350μL de água Milli Q.

Para análise do polimorfismo genético foram utilizados os *primers*: P1: 5' CAG GGT GCT GCT CAC ACT GGA CCC C 3' e P2: 5' CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T 3'. Os referidos *primers* são complementares às regiões dos códons polimórficos 174 e 235 localizados no éxon 2 do gene para o angiotensinogênio. A amplificação foi obtida por PCR em 35 ciclos de 92°C por 3 minutos; 92°C por 5 segundos; 63,8°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos seguidos de 72°C por 10 minutos. O produto de amplificação foi submetido à enzima de restrição *TthIII* I e incubado a 65°C *overnight*, para clivagem das seqüências amplificadas em regiões específicas 5' GACN↓NNGTC...3' e 3' CTGNN↓NCAG...5'.

Os genótipos reconhecidos pela proporção em número de pares de bases, foram identificados por fragmentos de 165pb referente ao genótipo MM, 165pb e 141pb para MT e 141pb equivalente a TT. Para a análise, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% preparada com tampão TAE (Ácido Acético 0,89M; TRIS base 0,89M; EDTA de sódio 0,025M) diluído 60 vezes, acrescido de um corante de 30% de glicerol; 0,05% xileno cianol e 0,05% azul de bromofenol, utilizando DNA controle de 100pb da GIBCO, digerido pela enzima de restrição *TthIII* I, que gera fragmentos de até 165pb e 141pb sob corrente contínua 110 V por 1 hora. Os indivíduos foram classificados, de acordo com o genótipo em: M/M, M/T, T/T. (Figura 13).



M: marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder/Gibco); (-) controle negativo; genótipos MM (65pb); MT(165 e 141 pb) e TT (141 pb); pb= pares de bases.

Figura 13- Foto mostrando padrão de banda eletroforética no polimorfismo do gene do angiotensinogênio em gel de agarose corado com brometo de etídeo (1,5%).

3- Estatística

3.1- Análise descritiva

Com o objetivo apenas de caracterizar as amostras estudadas, apresentamos, em forma de tabelas e gráficos, as frequências relativas (percentuais) e absolutas das classes de cada variável qualitativas. Para as variáveis quantitativas, foram utilizadas tamanho da amostra (N), médias e desvios-padrão, para indicar a variabilidade dos dados.

A análise descritiva da reatividade vascular arterial, manifestada por meio da variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo mecânico (compressão da artéria braquial) ou farmacológico (nitroglicerina sublingual), bem como a variação do

fluxo no segmento examinado, frente aos estímulos, foi expressa em variação percentual média e desvio-padrão. A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de comparação de Dunnet.

3.2- Análise inferencial

Para compara as frequências alélicas e genóticas entre os grupos foi utilizado o teste Qui-Quadrado. O teste exato de Fisher foi utilizado nas situações em que o valor esperado foi inferior a 5. Antes dos testes de comparações de médias foi realizada uma análise para testar a hipótese de que os dados seguissem uma distribuição normal, pelo teste de Kolmogorov-Smimov.

Utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney e quando o objetivo foi testar a hipótese de que duas populações têm a mesma distribuição e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis quando comparamos mais de duas populações.

Para comparação de variáveis numéricas entre os grupos foi utilizado o teste “t”. Para comparação entre três grupos de genótipos foi utilizada a Análise de Variância Simples (One-way ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de Tukey. A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo foi avaliada em relação a qualquer desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg por intermédio do teste de Qui-Quadrado. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos erros α fossem $\leq 5\%$.

Foram usados na elaboração do relatório técnico os softwares: MS Office Excel versão 2000 para o gerenciamento do banco de dados; SPSS for Windows versão 11.5 - Statistical Package for the Social Science (SPSS Inc Chicago IL - USA). Para a execução dos cálculos estatísticos, elaboração e edição de gráficos GraphPrism 4 Software (GraphPad Software Inc. SanDiego CA - USA), para elaboração de tabelas e redação usamos o MS Office Word versão 2003 e para referências bibliográficas End Note 9.0 (Thomson Co. Stamford Conn - EUA).

Capa resultados

1- Dados demográficos, antropométricos e clínicos

Com relação à idade não se observou diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos: HAR versus HT e HAR versus CT. Entretanto, a comparação dos grupos HT versus CT apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa para altura entre os três grupos. Houve diferença estatisticamente significativa para peso e índice de massa corporal, entre os grupos HAR e CT ($P < 0,05$). Os pacientes do grupo HAR apresentaram maior peso do que os pacientes do grupo HT e os indivíduos do grupo CT, com IMC de $31,2 \pm 5,9 \text{ kg/m}^2$, $28,1 \pm 4,8 \text{ kg/m}^2$ e $25,7 \pm 3,7 \text{ kg/m}^2$ observados nos grupos HAR, HT e CT respectivamente ($P < 0,05$). Os valores pressóricos médios sistólico e diastólico do grupo HAR aferidos durante a consulta ambulatorial foram superiores e compatíveis com a caracterização clínica de refratariedade (Tabela 1).

Tabela 1- Características demográficas, antropométricas e clínicas dos três grupos estudados.

	HAR	HT	CT
Idade (a)	$50,0 \pm 9,1$	$52,2 \pm 11,1$	$44,2 \pm 13,8$
Sexo: M	44%	29%	36%
F	56%	71%	64%
Peso (kg)	$82,6 \pm 17,1^*$	$73,1 \pm 14,1$	$71,1 \pm 13,0$
Altura (cm)	$163,4 \pm 11,1$	$162,0 \pm 8,9$	$166,0 \pm 9,0$
IMC (kg/m²)	$31,2 \pm 5,9^*$	$28,1 \pm 4,8$	$25,7 \pm 3,7$
PAS (mmHg)	$163,1 \pm 25,2^*$	$134,1 \pm 11,7$	$119,5 \pm 7,7$
PAD (mmHg)	$101,6 \pm 12,7^*$	$81,3 \pm 7,2$	$76,9 \pm 4,5$
N	70	80	70

Os valores são expressos em média $\pm$ DP. * $P < 0,05$ HAR versus HT e CT.

N= número de indivíduos; HAR= hipertensão arterial refratária; HT= hipertensão arterial controlada; CT= Controle; IMC= índice de massa corporal; PAS= pressão arterial sistólica; PAD= pressão arterial diastólica; M= masculino; F= feminino.

2- Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA)

Os valores médios da PAS 24 h (PAS 24h), PAD 24 h (PAD 24h), PAS em vigília (PAS vigília), PAD em vigília (PAD vigília), PAS durante o sono (PAD sono), PAD durante o sono (PAD sono), pressão de pulso de 24 h (PP 24h), pressão de pulso em vigília (PP vigília), pressão de pulso durante o sono (PP sono), PA média de 24 h (PAM 24h), PA média em vigília (PAM vigília) e da PA média durante o sono (PAM sono) registradas nos três grupos estão sumarizados na Tabela 2. Todos os valores pressóricos registrados por intermédio da MAPA foram superiores no grupo HAR em comparação aos grupos HT e CT e compatíveis com a caracterização clínica de HAR ($P < 0,01$).

Tabela 2- Resultados da monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA) nos três grupos estudados.

	HAR	HT	CT
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
PAS 24 h	156,8 ± 16,0*	134,2 ± 11,3	113,9 ± 6,5
PAD 24 h	99,3 ± 10,0*	82,8 ± 9,0	70,6 ± 3,7
PAS vigília	159,5 ± 16,1*	136,6 ± 12,2	116,6 ± 5,7
PAD vigília	102,5 ± 10,7*	85,0 ± 10,2	74,1 ± 4,3
PAS sono	152,1 ± 17,9*	127,4 ± 14,0	107,0 ± 8,3
PAD sono	94,4 ± 9,7*	78,2 ± 8,5	63,6 ± 3,3
PP 24 h	57,5 ± 11,3*	51,1 ± 7,7	43,7 ± 4,9
PP vigília	57,0 ± 11,1*	52,0 ± 7,7	42,7 ± 5,8
PP sono	57,7 ± 12,9*	48,6 ± 8,2	43,4 ± 5,7
PAM 24 h	123,0 ± 11,6*	98,1 ± 10,0	85,3 ± 4,2
PAM vigília	126,0 ± 12,0*	100,2 ± 11,2	88,7 ± 4,1
PAM sono	118,2 ± 12,1*	91,9 ± 11,1	78,4 ± 5,2
N	70	80	70

Os valores são expressos em média ± DP. * $P < 0,001$ vs. HT e CT

N= número de indivíduos; HAR= hipertensão arterial refratária; HT= hipertensão arterial controlada; CT= Controle; PAS= pressão arterial sistólica; PAD= pressão arterial diastólica; PP= pressão de pulso; PAM pressão arterial média.

3- Perfil bioquímico

Os níveis médios de glicemia e de hemoglobina glicosilada A1c quantificados nos três grupos, não mostraram diferença estatisticamente significativa (glicemia $99,4 \pm 16,6$; $94,7 \pm 24,5$ e $88,6 \pm 12,5$ mg/mL; Hb A1c $6,8 \pm 0,8$; $5,9 \pm 0,6$ e $5,2 \pm 0,5$ nos grupos HAR, HT e CT respectivamente). As concentrações plasmáticas de colesterol total, LDLc, HDLc, triglicérides, creatinina, uréia, hemoglobina, hematócrito, transferases hepáticas, desidrogenase láctica, creatinina fosfoquinase, hormônio estimulante da tireóide (TSH), tiroxina livre (T4 livre), proteinúria 24 h, *clearance* de creatinina e ácido úrico verificados nos grupos HAR, HT e CT não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si. Entretanto, a excreção urinária de sódio em 24 horas, os níveis plasmáticos de aldosterona e a atividade plasmática da renina encontram-se significativamente elevados no grupo HAR quando comparados aos grupos HT e CT. Na^+ urinário 24 h: $228,6 \pm 85,6$ mEq/ 24 h, $175,6 \pm 51,5$ mEq/ 24 h e $171,0 \pm 44,4$ mEq/ 24 h nos grupos HAR, HT e CT, respectivamente, $P < 0,01$ HAR vs. HT e CT. As concentrações plasmáticas de aldosterona, determinadas nos três grupos foram respectivamente, $14,8 \pm 3,1$ ng/mL, $9,0 \pm 1,5$ ng/mL e $8,4 \pm 3,1$ ng/mL. Finalmente a quantificação da atividade plasmática da renina, realizada nos três grupos experimentais registrou respectivamente, $2,5 \pm 1,2$ ng/mL/h, $1,6 \pm 0,7$ ng/mL/h e $1,0 \pm 0,6$ ng/mL/h nos grupos HAR, HT e CT, respectivamente, com aumento significativo em HAR comparado aos demais, $P < 0,01$. (Tabela 3).

Tabela 3- Valores bioquímicos dos três grupos estudados.

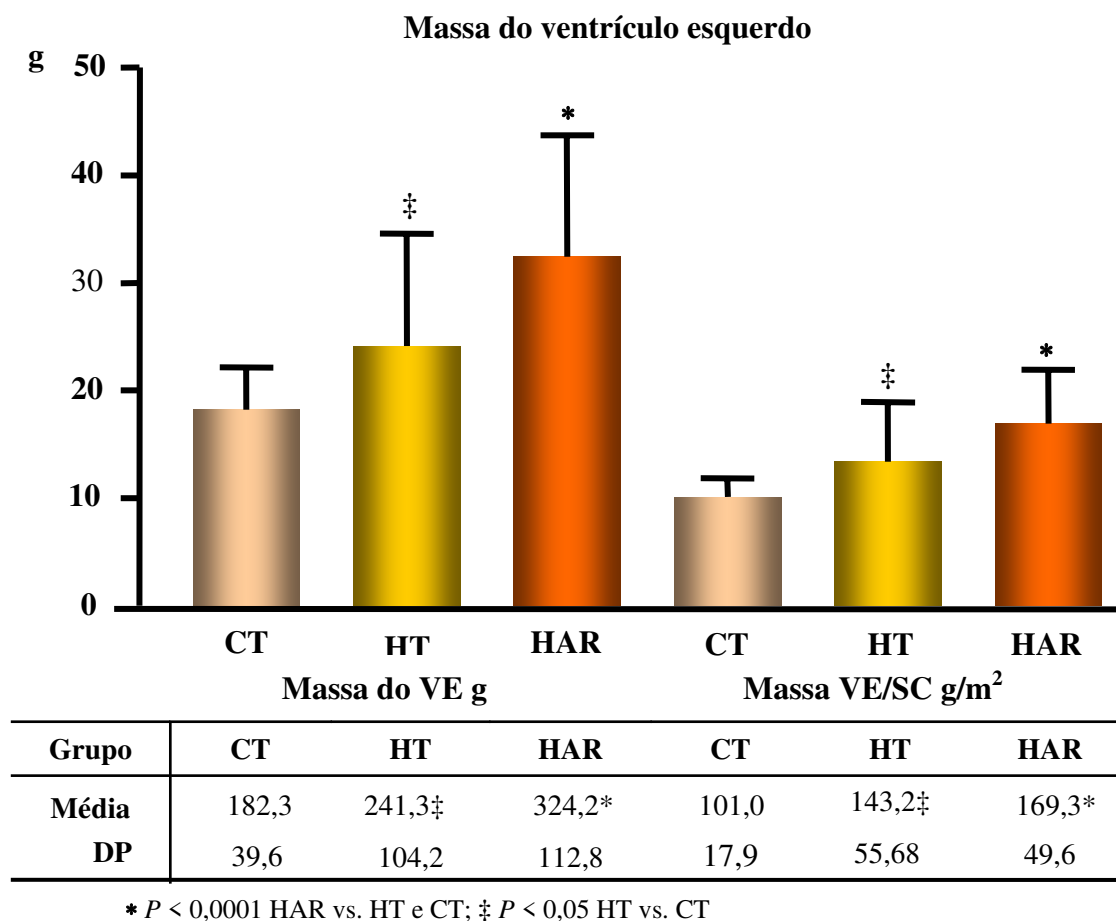
	HAR	HT	CT
Glicemia (mg/dL)	99.4±16.6	94.9±24.6	86.1±10.1
Hb glicosilada A1c	6,8 ± 0,8	5,9 ± 0,6	5,2 ± 0,5
Colesterol total (mg/dL)	206.6±47.0	206.7±36.9	209.7±37.8
LDL colesterol (mg/dL)	134.6±41.7	127.2±31.1	126.6±50.7
Triglicérides (mg/dL)	165.2±108.9	159.0±80.0	158.0±74.6
Creatinina (mg/dL)	1.0±0.3	0.9±0.2	0.86±0.1
Uréia (mg/dL)	36,4±8,3	36,4±8,3	32,5±13,4
Hemoglobina (g/100 mL)	14,6±1,0	14,6±1,0	13,1±1,3
Hematócrito (%)	45,0±3,2	45,0±3,2	40,4±4,4
AST (mg/dL)	27,2±6,0	27,2±6,0	19,5±10,0
ALT (mg/dL)	27,4±5,6	27,4±6,0	16,3±3,1
DHL (mg/dL)	257,0±33,0	327,2±32,5	348,3±8,7
CPK (mg/dL)	99,4±32,2	79,3±15,0	109,8±62,7
Na⁺ urinário 24 h mEq/ 24h	228,6 ± 85,6*	175,6 ± 51,5	171,0 ± 44,4
Atividade de renina ng/mL/h	2,5±1,2*	1,6 ±0,7	1,0±0,6
Aldosterona ng/mL	14,8±3,1*	9,0±1,5	8,8±3,1
Relação aldosterona/APR	5,9±2,6	5,6±2.1	8,8±5,2
N	70	80	70

Os valores são expressos em média ± DP. * $P < 0,01$ HAR vs. HT e CT

N= número de indivíduos; HAR= hipertensão arterial refratária; HT= hipertensão arterial controlada; CT= Controle; LDLc= fração do colesterol de lipoproteína de baixa densidade; ALT= alanina transferase; AST= aspartato transferase; DHL= desidrogenase láctica; CPK= creatinafosfoquinase; APR= atividade plasmática de renina.

4- Avaliação da massa do ventrículo esquerdo

Os resultados da avaliação da massa do ventrículo esquerdo calculadas pela fórmula de Devereux modificada, foram respectivamente $324,2 \pm 112,8$ g; $241,3 \pm 104,2$ g e $182,3 \pm 39,6$ g nos grupos HAR, HT e CT ($P < 0,0001$ HAR vs. HT e CT). O índice de massa ventricular, com uso da superfície corpórea (SC), observada no grupo HAR foi maior em comparação aos grupos HT e CT ($P < 0,0001$ HAR vs. HT e CT) (Figura 14).



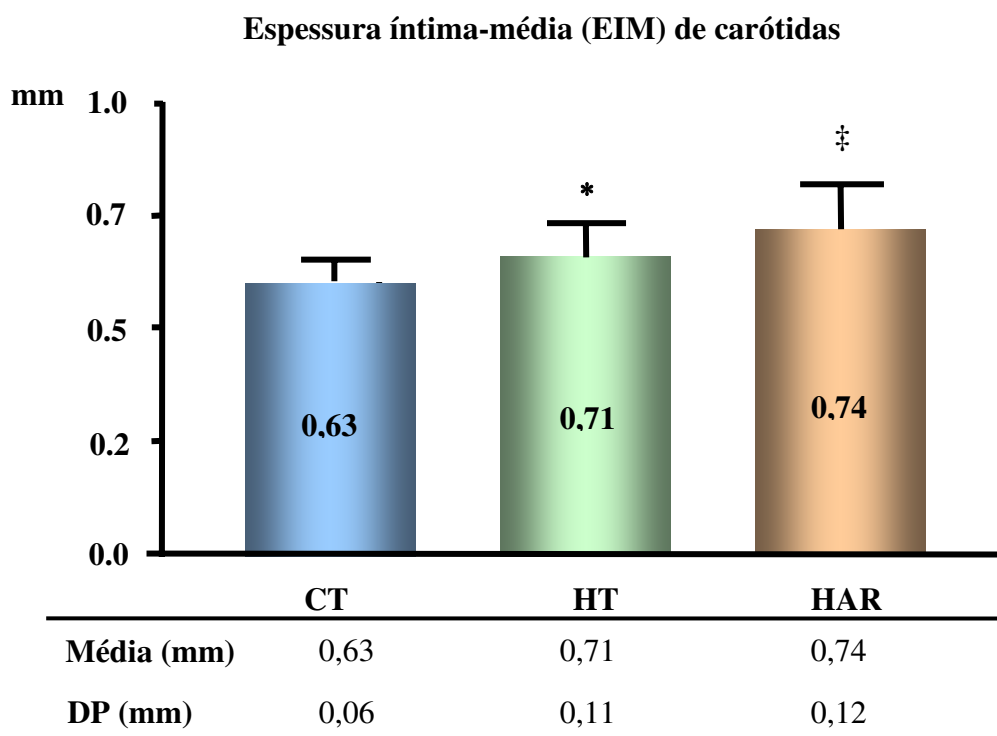
N= número de indivíduos; HAR= hipertensão arterial refratária; HT= hipertensão arterial controlada; CT= Controle; VE= ventrículo esquerdo; SC= superfície corpórea.

Figura 14- Resultados da avaliação da massa do ventrículo esquerdo (VE g) e da relação massa/SC (g/m^2) nos três grupos experimentais HAR, HT e CT, valores expressos em média $\pm$ DP.

5- Avaliação da Espessura Íntima - Média das Carótidas

Os resultados da mensuração da EIM das carótidas, observados nos três grupos (HAR, HT e CT) são apresentados na Figura 15.

O grupo HAR evidenciou aumento estatisticamente significativo da EIM quando comparado ao grupo CT ($0,74 \pm 0,12$ mm versus $0,63 \pm 0,06$ mm; $P < 0,0001$). Da mesma forma, o grupo HT quando comparado com o grupo CT apresentou diferença estatisticamente significativa ($0,71 \pm 0,11$ mm versus $0,63 \pm 0,06$ mm; $P < 0,01$). Por outro lado, não observamos diferença estatística significativa para EIM entre os grupos HAR e HT ($P > 0,05$; Figura 15).



* $P < 0,01$ HT vs. CT; ‡ $P < 0,001$ HAR vs. CT; $P = 0,02$ HAR vs. HT

HAR= hipertensão arterial refratária; HT= hipertensão arterial controlada; CT= Controle; D= desvio padrão.

Figura 15- Resultados da avaliação da espessura íntima - média de carótidas (EIM) nos três grupos HAR, HT e CT, valores expressos em média $\pm$ DP.

6- Avaliação da Reatividade Vascular

Os resultados da variação absoluta do diâmetro da artéria braquial observados nos três grupos (HAR, HT e CT) durante a avaliação da função vascular dependente e não dependente do endotélio utilizando ultra-som de alta resolução são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Valores absolutos (mm) da variação do diâmetro da artéria braquial em resposta a estímulo mecânico (vasodilatação mediada pelo fluxo-VMF) e estímulo farmacológico (vasodilatação nitroglicerina induzida) nos três grupos em estudo.

	HAR	HT	CT
Parâmetros	Média ± DP	Média ± DP	Média± DP
Diâmetro basal Artéria braquial (mm)	3,9 ± 0,6	3,7 ± 0,6	3,6 ± 0,6
Diâmetro Artéria braquial pós VMF (mm)	4,3 ± 0,6	4,2 ± 0,6	4,1 ± 0,7
Diâmetro Artéria braquial recuperação (mm)	3,9 ± 0,6	3,7 ± 0,6	3,6 ± 0,6
Diâmetro Artéria braquial pós NTG (mm)	4,5 ± 0,6	4,4 ± 0,6	4,4 ± 0,6

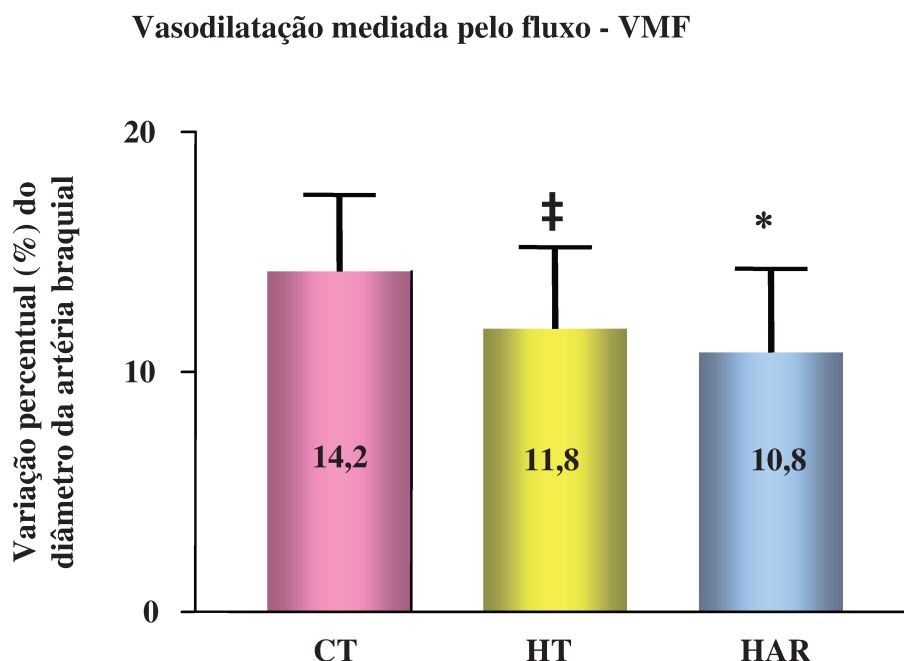
HAR= hipertensão arterial refratária; HT= hipertensão arterial controlada; CT= Controle; DP= desvio padrão; VMF= vasodilatação mediada pelo fluxo; NTG= nitroglicerina.

6.1- Variação percentual do diâmetro da artéria braquial (vasodilatação mediada pelo fluxo - VMF)

Os resultados da avaliação da função vascular dependente do endotélio utilizando ultra-som de alta resolução e estímulo mecânico compressão/descompressão da artéria braquial (vasodilatação mediada pelo fluxo-VMF) observados nos três grupos (HAR, HT e CT) são apresentados na Figura 16. A variação percentual média do diâmetro da artéria braquial nos grupos HAR e HT foi significativamente menor que no grupo controle ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos HAR e HT.

6.2- Variação percentual do diâmetro da artéria braquial pós-estímulo farmacológico (nitroglicerina sublingual)

Os resultados da avaliação da função vascular não dependente do endotélio utilizando ultra-som de alta resolução e estímulo farmacológico (0,4 mg nitroglicerina sublingual) observados nos três grupos (HAR, HT e CT) são apresentados na Figura 17. A variação percentual média do diâmetro da artéria braquial nos grupos HAR e HT foi significativamente menor que no grupo controle ($P < 0,01$). Não houve diferença significativa entre os grupos HAR e HT.



Parâmetros	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
VMF	14,2±3,2	11,8 ± 3,4‡	10,8 ± 3,5*

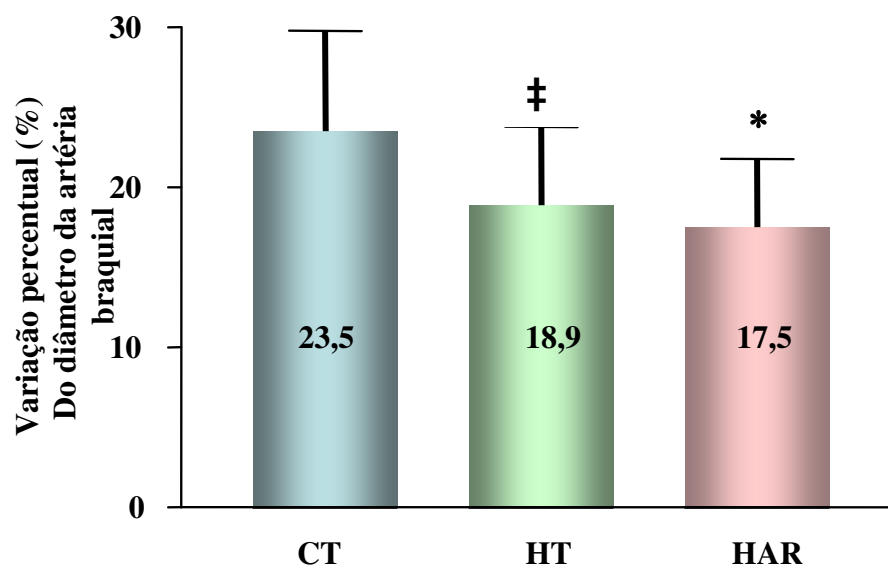
* $P < 0,001$ HAR vs. CT; ‡ $P < 0,001$ HT vs CT; $P > 0,05$ HAR vs. HT.

HAR= hipertensão arterial refratária; HT= hipertensão arterial controlada; CT= Controle; DP= desvio padrão;

VMF= vasodilatação mediada pelo fluxo.

Figura 16- Variação percentual (%) do diâmetro da artéria braquial em resposta a estímulo mecânico compressão/descompressão (vasodilatação mediada pelo fluxo-VMF).

Vasodilatação nitroglicerina mediada



Parâmetros	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
NTG	23,5±6,3	18,9 ± 4,9‡	17,5 ± 5,3*

* $P < 0,01$ HAR vs. CT; ‡ $P < 0,01$ HT vs. CT; $P > 0,05$ HAR vs. HT.

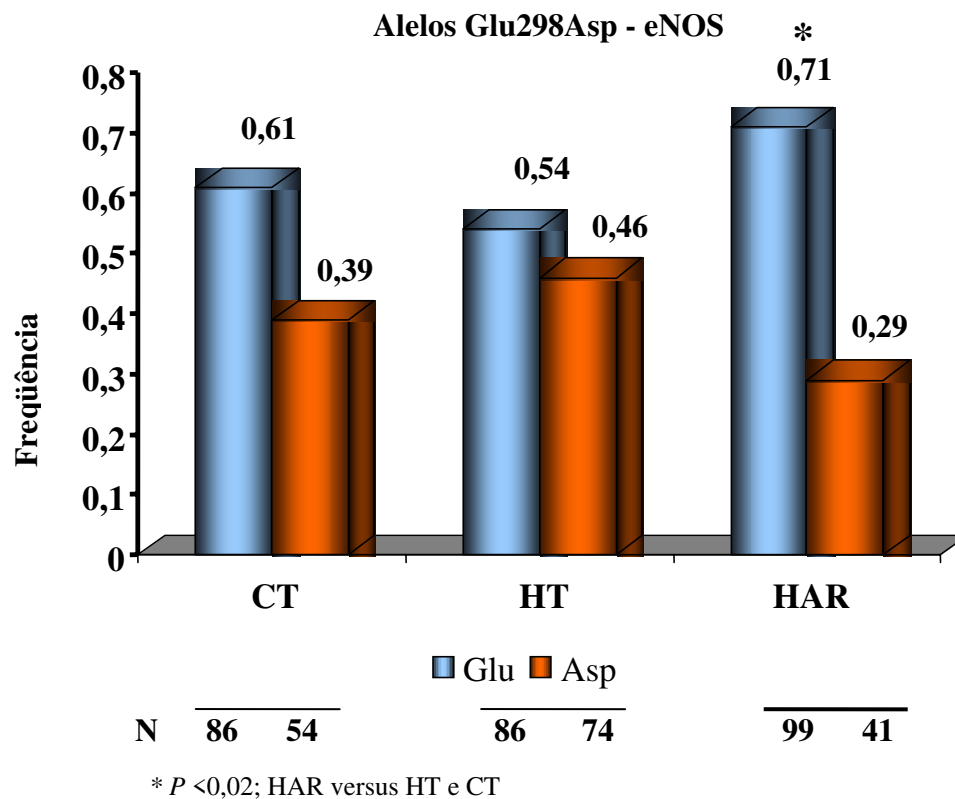
HAR= hipertensão arterial refratária; HT= hipertensão arterial controlada; CT= Controle; DP= desvio padrão; NTG= nitroglicerina.

Figura 17- Variação percentual (%) do diâmetro da artéria braquial em resposta a estímulo farmacológico não dependente do endotélio (mediada por doador de óxido nítrico - nitroglicerina 0,4 mg sublingual).

7- Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo Glu-Asp do gene para sintase endotelial do óxido nítrico

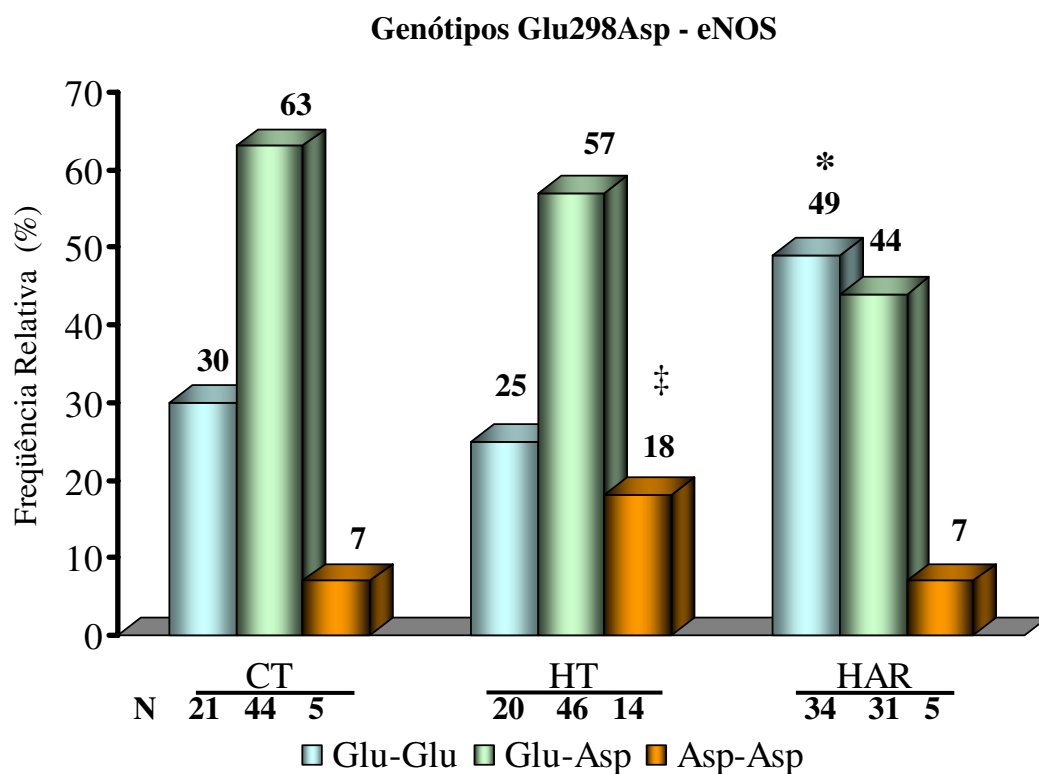
A distribuição dos alelos e genótipos para o polimorfismo Glu-Asp do gene para eNOS em pacientes com HAR, HT e indivíduos CT é apresentada nas Figuras 18 e 19. Notou-se frequência significativamente mais elevada para o alelo Glu no grupo de pacientes hipertensos refratários em relação ao grupo de indivíduos controles e ao grupo de pacientes hipertensos controlados (0,71 versus 0,61 e 0,54, respectivamente, $P < 0,02$).

O genótipo Glu-Glu foi mais freqüente no grupo de pacientes HAR em relação ao grupo de indivíduos CT e ao grupo de pacientes HT (49% versus 30% e 25%, respectivamente, $P < 0,02$). O genótipo Glu-Asp foi mais representado no grupo CT, sem mostrar diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos HT e HAR (63% versus 57% e 49% respectivamente, $P > 0,05$). O genótipo Asp-Asp foi mais freqüente no grupo HT em relação aos grupos CT e HAR (18% versus 7% e 7%, respectivamente $P < 0,03$).



N= frequência absoluta; P = nível de significância.

Figura 18- Distribuição de frequência alélicas para o polimorfismo Glu-Asp do gene para sintase endotelial do óxido nítrico [eNOS] em indivíduos controles (CT), pacientes com hipertensão controlada (HT) e hipertensão refratária (HAR).



* $P < 0,02$ vs. HT e CT; ‡ $P < 0,03$ vs. CT e HAR

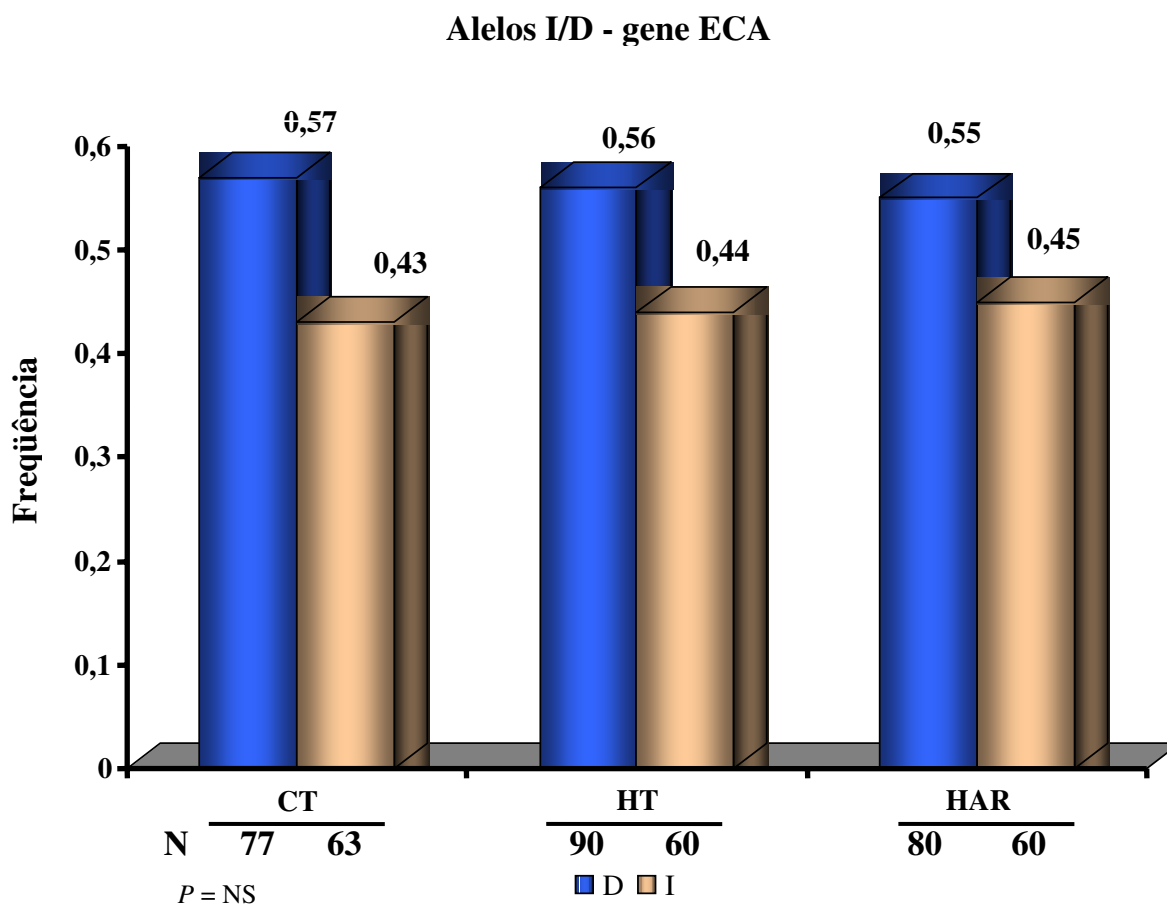
N= frequência absoluta; P = nível de significância.

Figura 19- Distribuição de frequências genotípicas para o polimorfismo Glu-Asp do gene para sintase endotelial do óxido nítrico [eNOS] (Glu-Glu, Glu-Asp e Asp-Asp) em indivíduos controles (CT), pacientes com hipertensão controlada (HT) e hipertensão refratária (HAR).

8- Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Inserção/Deleção do gene para enzima conversora da angiotensina

A distribuição dos alelos e genótipos para o polimorfismo I/D do gene para enzima conversora da angiotensina em pacientes HAR, HT e indivíduos CT é apresentada nas Figuras 20 e 21. A distribuição de frequências para os alelos D e I nos três grupos não mostrou diferença estatística significativa, destacando-se o alelo D nos grupos HAR, HT e CT respectivamente (0,55 versus 0,56 e 0,57).

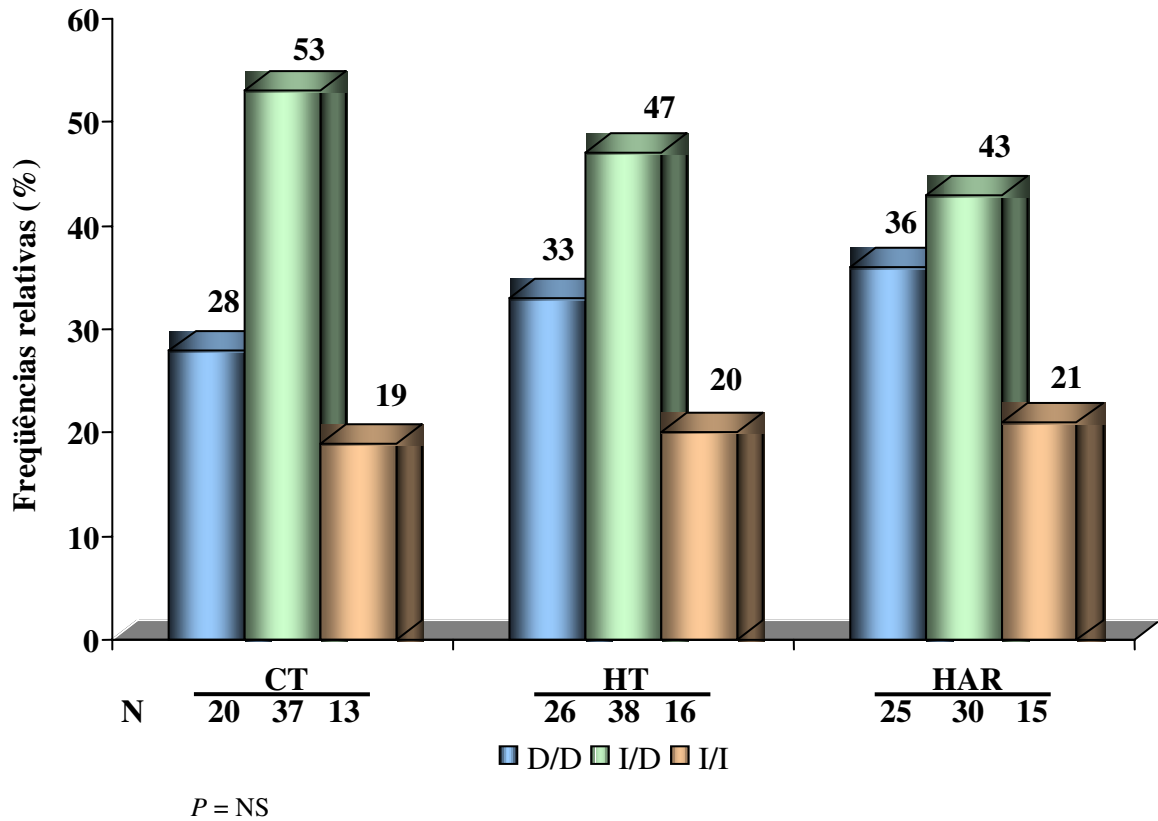
Da mesma forma, os genótipos D/D, I/D e I/I não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, destacando-se o genótipo I/D em CT (53%), HT (47%) e HAR (43%).



N= freqüência absoluta; P= nível de significância; NS= não significante.

Figura 20- Distribuição de freqüências alélicas para o polimorfismo Inserção/Deleção (I/D) do gene para enzima conversora da angiotensina [ECA] em indivíduos controles (CT), pacientes com hipertensão controlada (HT) e hipertensão refratária (HAR).

Genótipo I/D - gene ECA



N= freqüência absoluta; P = nível de significância; NS= não significativo.

Figura 21- Distribuição de freqüências genotípicas para o polimorfismo Inserção - Deleção para o gene da enzima conversora da angiotensina [ECA] (D/D, I/D e I/I) em indivíduos controles (CT), pacientes com hipertensão controlada (HT) e hipertensão refratária (HAR).

9- Freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo M235T do gene para angiotensinogênio

A distribuição dos alelos e genótipos para o polimorfismo M235T do gene para AGT em pacientes HAR, HT e indivíduos CT é apresentada nas Figuras 22 e 23. Notou-se freqüência significativamente mais elevada para o alelo T no grupo HAR em relação aos grupos HT e CT (0,65 versus 0,50 e 0,39, respectivamente, $P < 0,001$).

O genótipo T/T foi significativamente mais freqüente no grupo HAR em relação aos grupos HT e CT (43% versus 19% e 13%, respectivamente, $P < 0,001$). O genótipo M/T foi mais representado no grupo HT sem mostrar diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos CT e HAR (62% versus 51% e 44% respectivamente, $P > 0,05$). O genótipo M/M foi significativamente mais freqüente no grupo CT em relação aos grupos HT e HAR (36% versus 19% e 13%, respectivamente, $P < 0,005$).

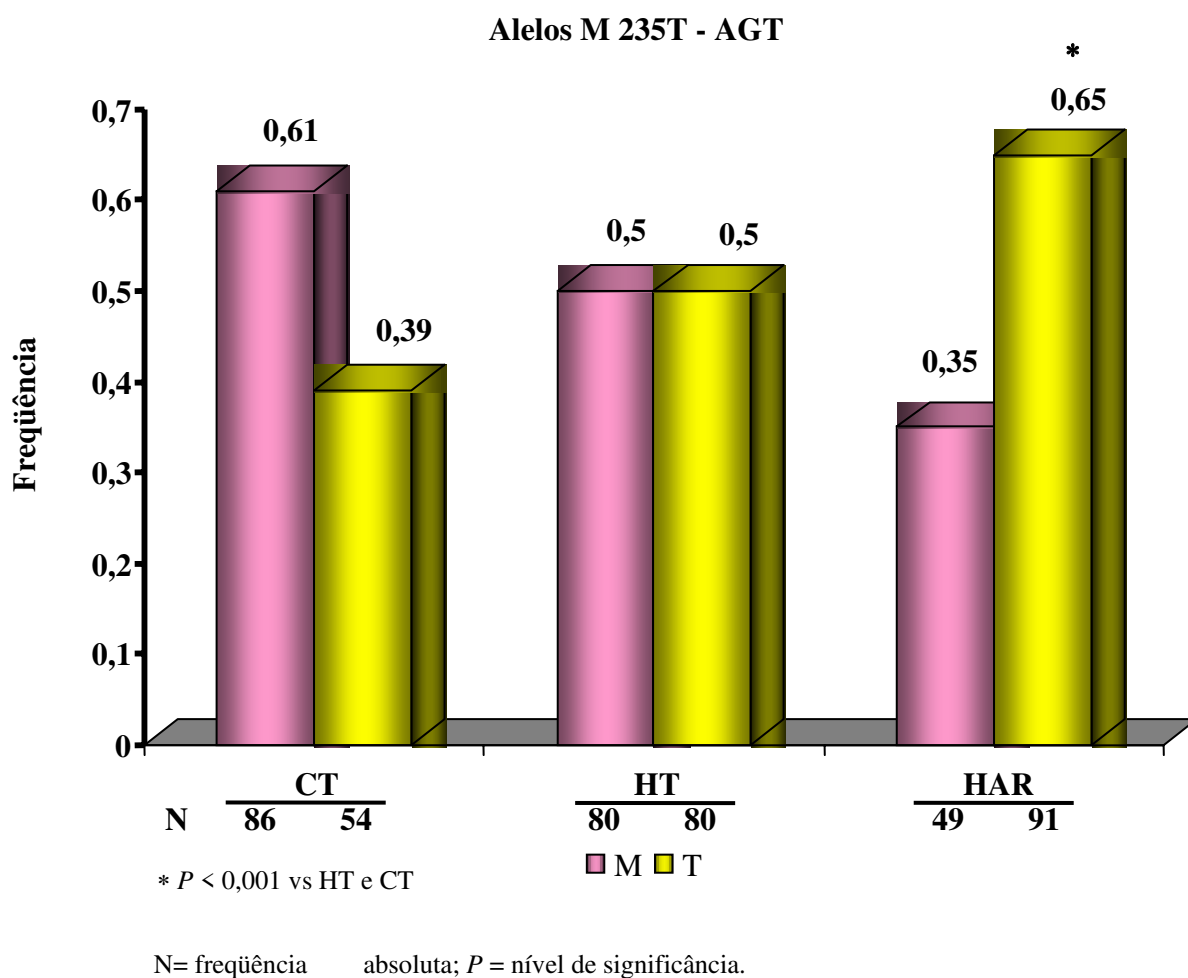


Figura 22- Distribuição de frequências alélicas para o polimorfismo M35T do gene do angiotensinogênio (AGT) em indivíduos controles (CT), pacientes com hipertensão controlada (HT) e hipertensão refratária (HAR).

Genótipos M235T - AGT

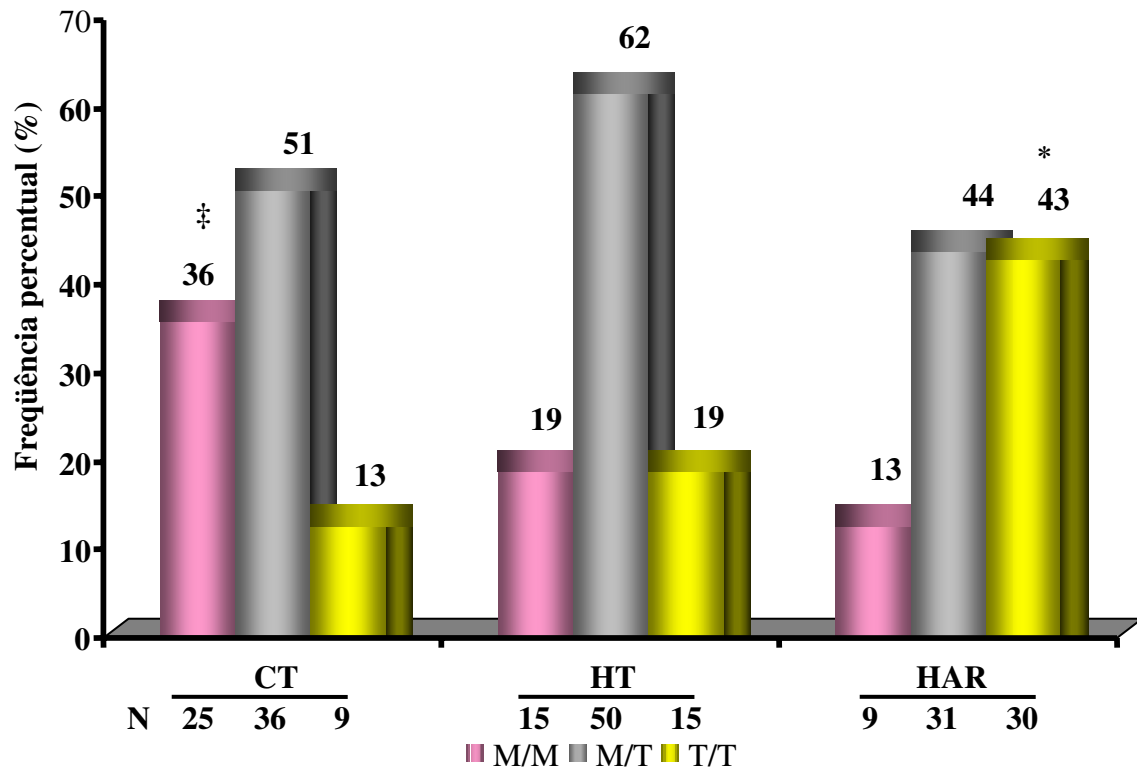


Figura 23- Distribuição de frequências genóticas para o polimorfismo M235T do gene do angiotensinogênio (AGT) em indivíduos controles (CT), pacientes com hipertensão controlada (HT) e hipertensão refratária (HAR).

10- Correlação dos polimorfismos dos sistemas renina - angiotensina aldosterona e óxido nítrico com alterações morfológicas e funcionais cardiovasculares

A correlação dos polimorfismos Glu-Asp da eNOS, I/D da ECA e M235T do AGT com as alterações morfológicas (massa de VE e espessura íntima - média de carótidas) e funcionais (vasodilatação dependente [VMF] e não dependente do endotélio [NTG]) são apresentadas na Tabela 5.

Houve associação estatisticamente significativa entre o genótipo T/T do polimorfismo M35T do gene para angiotensinogênio e alterações morfológicas, caracterizadas por aumento da massa do ventrículo esquerdo e da espessura íntima média das carótidas acompanhada de alterações funcionais, representadas por diminuição da vasodilatação dependente e não dependente do endotélio em pacientes com HAR. Houve também, associação estatisticamente significativa entre o genótipo M/T do polimorfismo do gene para angiotensinogênio e diminuição da vasodilatação mediada pelo fluxo e da vasodilatação induzida por nitroglicerina em pacientes com HAR.

Não houve associação estatisticamente significativa entre do polimorfismo I/D do gene para ECA e alterações morfológicas e funcionais cardiovasculares.

Houve associação estatisticamente significativa entre o genótipo Glu-Glu do polimorfismo do gene para eNOS e alterações morfológicas, caracterizadas por aumento da massa do ventrículo esquerdo e da espessura íntima média das carótidas acompanhada de alterações funcionais, representadas por diminuição da vasodilatação dependente e não dependente do endotélio em pacientes com HAR. Houve também, associação estatisticamente significativa entre o genótipo Glu-Asp do polimorfismo do gene para eNOS e diminuição da vasodilatação mediada pelo fluxo e da vasodilatação induzida por nitroglicerina em pacientes com HAR.

Não houve associação estatisticamente significativa entre polimorfismos Glu-Asp da eNOS, I/D da ECA e M235T do AGT com as alterações morfológicas (massa de VE e espessura íntima - média de carótidas) e funcionais (vasodilatação dependente [VMF] e não dependente do endotélio [NTG]) nos grupos HT e CT.

Tabela 5- Associação dos polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) e alterações morfológicas e funcionais cardiovasculares.

Genótipos	Massa do VE + EIM	VMF + NTG
AGT		
M/M	P = 0,05; $X^2 = 4,1$	P < 0,16; $X^2 = 1,9$
M/T	P < 0,001; $X^2 = 22,60$	P = 0,015; $X^2 = 5,8$
T/T	P = 0,0001; $X^2 = 26,88$	P < 0,0001; $X^2 = 17,7$
ECA		
D/D	P = 0,2; $X^2 = 2,6$	P = 0,3; $X^2 = 2,3$
I/D	P = 0,6; $X^2 = 5,9$	P = 0,7; $X^2 = 0,6$
I/I	P = 0,9; $X^2 = 1,2$	P = 0,9; $X^2 = 1,0$
eNOS		
Glu-Glu	P = 0,0001; $X^2 = 26,13$	P = 0,0001 $X^2 = 14,5$
Glu-Asp	P = 0,09; $X^2 = 2,8$	P = 0,005; $X^2 = 8,0$
Asp-Asp	P = 0,001; $X^2 = 22,85$	P = 0,1; $X^2 = 1,4$

VE= ventrículo esquerdo; EM= espessura íntima-média de carótida; VMF= vasodilatação mediada pelo fluxo; NTG= nitroglicerina; M= alelo M do gene do angiotensinogênio; T= alelo T do gene do angiotensinogênio; D= alelo D do gene da enzima conversora da angiotensina; I= alelo I do gene da enzima conversora da angiotensina; Glu= alelo Glu do gene da sintase endotelial do óxido nítrico; Asp= alelo Asp do gene da sintase endotelial do óxido nítrico; P= nível de significância; X^2 = Qui-quadrado.

Capa discussão

Os principais resultados do presente estudo mostraram: 1) prevalência semelhante de indivíduos não caucasianos e caucasianos, aumento do índice de massa corporal, elevação da concentração sérica de aldosterona, da atividade plasmática da renina e da excreção urinária de sódio em pacientes com HAR; 2) presença de alterações morfológicas caracterizadas por hipertrofia do ventrículo esquerdo e aumento da espessura íntima - média das carótidas (remodelamento cardiovascular) e alterações funcionais qualificadas como alteração da vasodilatação dependente (VMF) e não dependente do endotélio; 3) prevalência elevada do genótipo T/T do polimorfismo M235T do gene para angiotensinogênio e do genótipo Glu-Glu para eNOS nos pacientes com HAR, ambos em correlação estatisticamente significativa com alterações morfológicas e funcionais cardiovasculares.

Neste estudo, uma avaliação do perfil clínico, demográfico, antropométrico, bioquímico e de diagnóstico por imagem foi realizada para caracterização dos pacientes com HAR. A idade do grupo HAR variou de 29 a 65 anos (média= $50,0 \pm 9,1$ anos). Entre os pacientes com HAR 44% eram do sexo masculino e 56% do sexo feminino, Com relação à etnia 53% dos indivíduos com HAR eram caucasianos. O índice de massa corporal foi de $31,2 \pm 5,9$ kg/m². Os valores pressóricos médios sistólico e diastólico do grupo HAR aferidos durante a consulta ambulatorial, foram superiores e compatíveis com a caracterização clínica de refratariedade.

O estudo de revisão de GARG *et al.* (2005) comparando uma coorte da Universidade RUSH com os resultados de YAKOVLEVITCH e BLACK da Universidade YALE publicados em 1.991 mostrou em ambos os estudos prevalência semelhante de HAR em torno da sexta década de vida (média de idade de 57 ± 14 anos), dos quais, 45% e 42% eram do sexo masculino com prevalência de 45% e 84% de caucasianos, respectivamente. O estudo da Universidade YALE não avaliou o IMC no grupo de pacientes com HAR. Por outro lado, o IMC aferido no estudo da Universidade RUSH foi de 32 ± 7 kg/m² com 85% de adesão ao tratamento anti-hipertensivo. Os resultados do presente estudo referentes à idade, sexo, faixa etária, IMC e taxa de adesão são concordantes com aqueles do estudo do serviço de hipertensão da Universidade RUSH.

Neste estudo, uma abordagem genética foi utilizada para investigar a participação dos polimorfismos de base única dos genes que codificam os componentes do SRAA tais como o polimorfismo inserção/deleção da ECA, a variante M235T do AGT e o polimorfismo Glu-Asp do gene da eNOS em pacientes com HAR. A importância da participação do óxido nítrico na fisiopatologia da HA tem sido amplamente demonstrada, através de inúmeras evidências clínicas e experimentais, publicadas nas duas últimas décadas (FERRO e WEBB, 1997; MOMBOULI e VANHOUTTE, 1999; PANZA, 1997; VANHOUTTE, 1996; ZATZ e BAYLIS, 1998). Desta forma, é concebível que anormalidades na atividade da enzima que sintetiza óxido nítrico nas células endoteliais (sintase endotelial do óxido nítrico - eNOS) possam levar a deficiência da disponibilidade de NO e cursar com hipertensão arterial.

Alguns estudos dos polimorfismos do gene para eNOS mostraram maior relevância clínica, como o polimorfismo do éxon 7 localizado no cromossomo 7 q35-36 humano que resulta na substituição do resíduo 298 de glutamato por aspartato (LAMAS *et al.*, 1992). Esta alteração foi descrita como responsável pela redução da atividade da eNOS, e conseqüente redução da geração de óxido nítrico, uma vez que a eNOS é mais suscetível à clivagem em indivíduos homozigotos para esta variante (YOON *et al.*, 2000). Por outro lado, estudos de associação entre variantes da eNOS e doenças cardiovasculares, particularmente HA, têm mostrado resultados discrepantes.

Alguns estudos mostraram associação entre o polimorfismo Glu-Asp do gene para eNOs e HA em diferentes grupos étnicos. Há referências de associação entre a variante 298Asp e HA primária na população japonesa (MIYAMOTO *et al.*, 1998; NAKAYAMA *et al.*, 1999; UWABO *et al.*, 1998). Todavia, LACOLLEY *et al.*, estudando populações caucasiana, relataram resultados contraditórios demonstrando associação entre o alelo Glu298 e HA (LACOLLEY *et al.*, 1998). SHOJI *et al.* também demonstraram maior prevalência do alelo 298Asp em indivíduos hipertensos quando comparados a normotensos (0,128 vs. 0,08, $P < 0,05$; OR = 1,8 , IC 95% 1,1-3,0) (SHOJI *et al.*, 2000). Resultados semelhantes foram descritos em uma população finlandesa (PULKKINEN *et al.*, 2000). Da mesma forma, grandes estudos populacionais confirmaram essa associação (CHEN *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2001; HYNDMAN *et al.*, 2002;

JIA *et al.*, 2003; LI, R. *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006). Em outro estudo, também demonstraram associação positiva entre polimorfismo Glu298Asp e resistência à terapia anti-hipertensiva. (JACHYMOVA *et al.*, 2001).

Entretanto, outros pesquisadores não confirmaram associação do polimorfismo Glu298Asp do gene da eNOS e HA (BENJAFIELD e MORRIS, 2000; BONNARDEAUX *et al.*, 1995; DEREBECKA *et al.*, 2002; JACHYMOVA *et al.*, 2001; KAJIYAMA *et al.*, 2000; KARVONEN *et al.*, 2002; KATO *et al.*, 1999; KISHIMOTO *et al.*, 2004; LAPU-BULA *et al.*, 2005; NEUGEBAUER *et al.*, 2000; WOLFF *et al.*, 2005). Destacam-se os resultados do estudo SUITA, publicados em 2001 mostrando semelhança entre indivíduos normotensos e hipertensos para o polimorfismo Glu298Asp do gene para eNOS em uma população da região norte do Japão (TSUJITA *et al.*, 2001).

Neste estudo, o grupo de pacientes com HAR mostrou maior prevalência do alelo Glu em relação aos grupos CT e HT. A análise dos genótipos, que estavam em equilíbrio de Hardy - Weinberg, também detectou maior prevalência do genótipo Glu-Glu nos pacientes com HAR. Desta forma, como na maioria dos trabalhos publicados na literatura, o presente estudo não demonstrou associação da variante polimórfica 298Asp do gene para eNOS com elevação dos valores da pressão arterial ou com alterações morfológicas e funcionais pesquisadas em pacientes com HAR. No entanto, os pacientes com HT apresentaram maior frequência do genótipo Asp-Asp, comparado aos outros dois grupos.

O polimorfismo I/D da ECA foi descrito por RIGAT *et al.* em 1.990 com associação entre o alelo D e aumento da concentração plasmática da ECA. Nesse caso o genótipo D/D foi relacionado à elevação duas vezes maior dos níveis plasmáticos da ECA, comparado ao homozigoto I/I, enquanto os heterozigotos apresentaram níveis intermediários (RIGAT *et al.*, 1990). Outros estudos validaram esse trabalho inicial e confirmaram a associação do genótipo D/D com aumento dos níveis da ECA circulante e tecidual (DANSER *et al.*, 1995; MALIK *et al.*, 1997; TIRET *et al.*, 1992). Posteriormente, estudos de correlação entre o polimorfismo da ECA e DCV foram amplamente relatados. Alguns autores apontaram associação significativa entre o alelo D e aumento do risco de

DAC incluindo DAC precoce, infarto e morte prematura (CAMBIEN *et al.*, 1992). Esta associação foi particularmente significativa no grupo de pacientes de baixo risco, para os quais o risco relativo de infarto agudo do miocárdio atribuível ao genótipo D/D foi de 35 % comparado com 8% observado em todo o grupo do estudo ECTIM - *Etude Cas-Temoin e l'Infarctus du Myocarde* (CAMBIEN *et al.*, 1994).

Entretanto, estudos de associação entre HA e polimorfismo da ECA são controversos. A primeira citação da ausência de correlação entre níveis plasmáticos da ECA e HA ou entre genótipo D/D e HA foi publicado em 1992 (JEUNEMAITRE *et al.*, 1992). Corroboraram estes achados trabalhos publicados por outros autores (BORECKI *et al.*, 1997; GINER *et al.*, 2001; MALIK *et al.*, 1997; SCHMIDT *et al.*, 1993; TURNER *et al.*, 1999). Por outro lado, grandes estudos populacionais, como o *Framingham Heart Study*, evidenciaram associação e ligação do gene para ECA e HA em homens, mas não em mulheres (FORNAGE *et al.*, 1998; O'DONNELL *et al.*, 1998). Estudos com diferentes grupos étnicos também mostraram diferenças de distribuição dos genótipos do polimorfismo para ECA (BARLEY *et al.*, 1996; BLOEM *et al.*, 1996; DURU *et al.*, 1994; FOY *et al.*, 1996; MATHEW *et al.*, 2001) apontando para a importância da variação étnica na regulação gênica da atividade plasmática da ECA e a relação do polimorfismo I/D do gene para ECA e DCV.

Neste estudo, a distribuição de alelos para o polimorfismo I/D da ECA mostrou prevalência semelhante do alelo D nos grupos HAR, HT e CT (0,55; 0,56 e 0,57, respectivamente). Da mesma forma, a distribuição dos genótipos (D/D, I/D e I/I) que estavam em equilíbrio de Hardy - Weinberg não mostraram diferenças estatísticas significantes entre os três grupos, e também, não apresentou associação com alterações morfológicas e ou funcionais cardiovasculares. Esses resultados foram semelhantes àqueles apresentados por vários autores. (BORECKI *et al.*, 1997; GINER *et al.*, 2001; JEUNEMAITRE *et al.*, 1992; MALIK *et al.*, 1997; SCHMIDT *et al.*, 1993; TURNER *et al.*, 1999). Também, estudos multicêntricos e de metanálise não encontraram associação entre o polimorfismo I/D com fenótipos relacionados a risco cardiovascular, dentre eles o *Physicians' Health Study* (LINDPAINTNER *et al.*, 1995),

o *Copenhagen City Heart Study* (AGERHOLM-LARSEN *et al.*, 1997) e uma metanálise com 46 estudos incluindo 32.715 pacientes (AGERHOLM-LARSEN *et al.*, 2000).

JENEUMAITRE *et al.*, (1992) estudando o polimorfismo M235T do gene para AGT demonstraram associação entre o alelo 235T HA primária e a níveis séricos mais elevados de AGT. Posteriormente, vários estudos publicados confirmaram esta associação, incluindo populações de países europeus (BORECKI *et al.*, 1997; CAULFIELD *et al.*, 1994; CAULFIELD *et al.*, 1996; HEGELE *et al.*, 1994; HEGELE *et al.*, 1996; JEUNEMAITRE *et al.*, 1993; PROCOPCIUC *et al.*, 2002; SETHI *et al.*, 2001), japoneses (HATA *et al.*, 1994; HATAE *et al.*, 1994; ISO *et al.*, 2000; IWAI *et al.*, 1995; KAMITANI *et al.*, 1994; NISHIUMA *et al.*, 1995), chineses (NIU *et al.*, 1998; TSAI *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2003) e brasileiros (PEREIRA *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2003).

KUNZ *et al.*, (1992; 1996), em estudo de metanálise, demonstraram em 5.493 pacientes caucasianos associação estatisticamente significante entre a variante 235T do gene para AGT e HA (OR = 1,20 IC 95%, 1,1 - 1,29). Mais recentemente, foi demonstrada associação do genótipo T/T do gene para AGT com elevação da PA em mulheres e não em homens provenientes do estudo *Copenhagen City Heart Study* (SETHI *et al.*, 2001). Neste estudo, encontrou-se com maior frequência a presença do alelo 235T do gene para AGT no grupo de pacientes com HAR, 0,65 versus 0,50 e 0,39 nos grupos de HT e CT, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que os genótipos do polimorfismo M235T do gene para AGT estavam em equilíbrio de Hardy - Weinberg com maior prevalência do genótipo T/T no grupo de pacientes HAR quando comparados aos grupos HT e CT (43% vs. 19% e 13%, respectivamente, $P < 0,0001$). Estes achados são concordantes com os resultados de PEREIRA *et al.* (2003) que analisaram uma casuística brasileira da cidade de Vitória ES e encontraram correlação positiva entre HA e a variante 235T do gene para AGT.

O estudo de metanálise realizado por AGERHOLM-LARSEN *et al.*, (2000) envolvendo 63 estudos com 45.267 participantes, mostrou a mutação M235T no gene para AGT associada com aumento em 5% nos níveis plasmáticos de AGT em heterozigotos M/T e aumento de 11% em homozigotos T/T quando comparados com homozigotos M/M.

De acordo com esses achados, heterozigotos e homozigotos T/T tiveram aumento significativo de 8% e 19% de risco de HA, respectivamente, quando comparados com homozigotos M/M. Uma tendência semelhante foi observada em indivíduos asiáticos, cujos homozigotos T/T tiveram aumento de 60% de risco para HA quando comparados a homozigotos M/M, enquanto os heterozigotos, tiveram um risco intermediário (ISO *et al.*, 2000; NISHIUMA *et al.*, 1995; NIU *et al.*, 1998).

Entretanto, outros estudos não confirmaram essa associação (BARLEY *et al.*, 1994; BERGE e BERG, 1998; BRAND *et al.*, 1998; FORNAGE *et al.*, 1995; HINGORANI *et al.*, 1996; MONDORF *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-PEREZ *et al.*, 2001; ROTIMI *et al.*, 1994; WINKELMANN *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2003). Estas discrepâncias provavelmente devem-se: 1) ao baixo poder estatístico destes estudos estreitamente relacionado ao tamanho da amostra; 2) aos critérios de seleção e exclusão como idade, presença de pseudo-hipertensão ou hipertensão do jaleco branco e hipertensão secundária não diagnosticada; 3) por se tratar de uma doença poligênica, o efeito de um gene pode ser encoberto por outro; 4) estratificação populacional ou diversidade étnica (SHIMASAKI *et al.*, 1998; TANUS-SANTOS *et al.*, 2001) e 5) foco na contribuição de apenas um polimorfismo para uma condição clínica específica.

As alterações morfológicas analisadas no presente trabalho, que foram respectivamente, a massa de ventrículo esquerdo e da EIM de carótidas e as funcionais, envolvendo a avaliação da reatividade vascular dependente e não dependente do endotélio mostraram: aumento da massa do ventrículo esquerdo nos pacientes com HAR em relação aos grupos HAT e CT. Houve também aumento da EIM carótidas com valores maiores nos pacientes com HAR em relação aos grupos HT e CT.

Com relação ao aumento da massa do VE, os resultados do *Framingham Heart Study* demonstraram de forma inequívoca o valor prognóstico da detecção de HVE na estratificação de risco para doença cardiovascular, morbidade e mortalidade (LEVY *et al.*, 1992). Dessa forma, indivíduos sadios acompanhados por um período de quatro anos e HVE definida como aumento da massa de VE para valores >143 g/m em homens e >102 g/m em mulheres mostraram risco de desenvolver doença cardiovascular 1,49 vezes maior em homens e 1,57 vezes maior em mulheres para cada incremento de

50 g/m de massa do VE. Este aumento da massa de VE foi associado a um aumento do risco relativo de morte cardiovascular de 1,73 em homens e 2,12 em mulheres e a um aumento de risco relativo de morte por todas as causas de 1,49 em homens e 2,01 em mulheres (LEVY *et al.*, 1990).

Da mesma forma, remodelamento vascular detectado mediante estimativa da EIM de carótidas tem sido relacionado à maior risco de eventos cardiovasculares totais, coronarianos e encefálicos (BALDASSARRE *et al.*, 2000; HOLLANDER *et al.*, 2003; SIMON *et al.*, 2002). Entre as várias explicações fisiopatológicas descritas, destaca-se a associação do aumento da EIM a maior variabilidade pressórica encontrada em hipertensos com remodelamento vascular (MANCIA *et al.*, 2001).

A contribuição do NO na regulação do tono vascular em humanos foi confirmada por estudos, usando-se pletismografia para mensuração do fluxo sangüíneo e a técnica da perfusão com agonistas (PANZA *et al.*, 1990). Foi confirmada também pela demonstração de que a inibição da síntese de NO resulta em redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio (FORTE *et al.*, 1997; PANZA, 1997). Da mesma forma, estudos de avaliação da vasodilatação da artéria braquial realizados em pacientes hipertensos mediante ultra-sonografia de alta resolução demonstraram decréscimo da resposta vasodilatadora à estimulação mecânica mediante compressão sustentada por cinco minutos da artéria braquial e posterior liberação da compressão arterial, denotando alteração da função dependente do endotélio (LI, J. *et al.*, 1997; YUGAR-TOLEDO *et al.*, 2005; YUGAR-TOLEDO *et al.*, 2004).

A correlação dessas alterações morfológicas com os polimorfismos genéticos do SRAA e da eNOS mostrou no presente estudo associação estatisticamente significativa entre a variante 235T do gene para AGT e alterações morfológicas cardiovasculares encontradas no grupo de pacientes com HAR, caracterizadas por aumento da massa do ventrículo esquerdo e da EIM das carótidas ($P= 0,0001$; $X^2= 26,88$). Na literatura, o polimorfismo T174M do gene do AGT em combinação com o polimorfismo I/D do gene para ECA tem sido associado à redução da vasodilatação dependente do endotélio em indivíduos normotensos, sustentando a hipótese de haver influência direta do SRAA sobre a função endotelial também em indivíduos sem HA (KURLAND *et al.*, 2001).

Estudos de correlação entre remodelamento vascular, avaliados mediante mensuração da EIM das carótidas e polimorfismo I/D do gene para ECA são controversos. Algumas publicações mostraram associação entre o alelo D e aumento da EIM, enquanto outros, não confirmaram esta associação (SAYED-TABATABAEI *et al.*, 2003). No presente estudo, não se encontrou associação entre polimorfismo I/D da ECA e aumento da EIM em pacientes com HAR. Além disso, também não se observou associação entre esse polimorfismo e alteração da reatividade vascular em pacientes com HAR. Por outro lado, BOZEC *et al.*, (2003) mostraram associação significativa entre o alelo T do polimorfismo do gene para AGT e aumento da EIM de carótidas em pacientes com HA, também observado neste estudo.

O polimorfismo Glu-Asp do gene para eNOS e sua associação com remodelamento cardiovascular foram analisados em 600 pacientes com HA em população finlandesa por KARVONEN *et al.*, (2002). Entre os principais resultados desse trabalho citam-se ausência de correlação entre a variante alélica do polimorfismo Glu-Asp do gene para eNOS e o remodelamento cardíaco e vascular. Em contrapartida os resultados do presente estudo mostram associação entre polimorfismo Glu-Glu do gene para eNOS, aumento da massa do ventrículo esquerdo e aumento da EIM de carótidas ($P = 0,0001$; $X^2 = 26,13$).

As avaliações funcionais realizadas neste estudo mostraram disfunção vascular, caracterizada por diminuição vasodilatação-dependente e não-dependente do endotélio em pacientes com HAR e HT, respectivamente, quando comparados aos indivíduos do grupo CT. Entretanto, estas alterações, não apresentaram associação com os polimorfismos do gene para ECA. Todavia, sabe-se que a ECA exerce inúmeras funções relacionadas ao SRAA e desta forma participa de importantes alterações do sistema cardiovascular. A inibição da ECA tem demonstrado ser capaz de reverter disfunção endotelial em pacientes com HA (CHARBONNEAU e ANDERSON, 1998; CREAGER e RODDY, 1994; HIROOKA *et al.*, 1992). Nesse contexto, demonstrou-se que o polimorfismo I/D pode estar envolvido na fisiopatologia da redução da vasodilatação induzida por acetilcolina em pacientes com hipertensão arterial (PERTICONE *et al.*, 1998).

Estudos prévios, como o de GUZIK *et al.*, (2001) também, não encontraram associação entre o polimorfismo Glu-Asp do gene para eNOS e alterações da reatividade vascular em humanos. Dessa forma, a presença do alelo Asp não demonstrou exercer qualquer efeito funcional direto sobre a disponibilidade vascular de NO. No entanto, neste estudo o genótipo Glu-Asp mostrou correlação positiva significativa com alteração da vasodilatação mediada pelo fluxo e a induzida por nitroglicerina.

Por outro lado, a análise das alterações da vasodilatação-dependente e não-dependente do endotélio encontradas no grupo de pacientes com HAR mostrou associação estatisticamente significativa entre disfunção vascular e maior prevalência da variante 235T do gene para AGT em pacientes com HAR, tanto em homozigotos ($P < 0,0001$; $X^2 = 17,7$) como em heterozigotos ($P = 0,015$; $X^2 = 5,8$). Dessa forma, esses achados são descritos pela primeira vez neste subgrupo de pacientes com HA.

Capa conclusões

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

Hipertensão arterial refratária tem distribuição equivalente entre indivíduos caucasianos e não caucasianos que apresentam fatores associados como: aumento do índice de massa corporal, elevação da concentração sérica de aldosterona, aumento da atividade plasmática da renina e da excreção urinária de sódio em 24 h.

Fenótipos intermediários caracterizados por remodelamento cardiovascular, aumento da massa do ventrículo esquerdo e da espessura íntima - média das carótidas destacam-se como alterações morfológicas associadas a presença de HA, principalmente HAR.

Alterações funcionais representadas pela disfunção vascular dependente e não-dependente do endotélio, estão envolvidas na expressão fenotípica de pacientes com HAR e HT.

O genótipo T/T do polimorfismo do gene para AGT e o Glu-Glu da eNOS têm maior prevalência em pacientes com HAR, contudo somente o genótipo TT do polimorfismo para AGT apresenta correlação com alterações estruturais e funcionais cardiovasculares. Enquanto, os genótipos Glu-Glu e Glu-Asp se correlacionam com alterações funcionais.

Capa referencias bibliográficas

Mortality rates after 10.5 years for participants in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Findings related to a priori hypotheses of the trial. The Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Jama*, 263: 1795-801, 1990.

[IV Brazilian guidelines in arterial hypertension]. *Arq Bras Cardiol*, 82 Suppl 4: 7-22, 2004.

ADAMS, M. R.; ROBINSON, J.; MCCREDIE, R.; SEALE, J. P.; SORENSEN, K. E.; DEANFIELD, J. E. et al. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 32: 123-7, 1998.

AGERHOLM-LARSEN, B.; NORDESTGAARD, B. G.; STEFFENSEN, R.; SORENSEN, T. I.; JENSEN, G.; TYBJAERG-HANSEN, A. ACE gene polymorphism: ischemic heart disease and longevity in 10,150 individuals. A case-referent and retrospective cohort study based on the Copenhagen City Heart Study. *Circulation*, 95: 2358-67, 1997.

AGERHOLM-LARSEN, B.; NORDESTGAARD, B. G.; TYBJAERG-HANSEN, A. ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 484-92, 2000.

AKPUNONU, B. E.; MULROW, P. J.; HOFFMAN, E. A. Secondary hypertension: evaluation and treatment. *Dis Mon*, 42: 609-722, 1996.

ALDERMAN, M. H.; BUDNER, N.; COHEN, H.; LAMPORT, B.; OOI, W. L. Prevalence of drug resistant hypertension. *Hypertension*, 11: II71-5, 1988.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357: 593-615, 2001.

ALPER, A. B., JR.; CALHOUN, D. A. Contemporary management of refractory hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 1: 402-7, 1999.

ANDERSON, T. J.; UEHATA, A.; GERHARD, M. D.; MEREDITH, I. T.; KNAB, S.; DELAGRANGE, D. et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*, 26: 1235-41, 1995.

ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, 43: 521-31, 1999.

ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol*, 10 Suppl 11: S30-9, 1999.

ARIMA, S.; ITO, S. New insights into actions of the renin-angiotensin system in the kidney: concentrating on the Ang II receptors and the newly described Ang-(1-7) and its receptor. *Semin Nephrol*, 21: 535-43, 2001.

ARNOLD, J. E.; HEALY, J. K. Hyperkalemia, hypertension and systemic acidosis without renal failure associated with a tubular defect in potassium excretion. *Am J Med*, 47: 461-72, 1969.

BALDASSARRE, D.; AMATO, M.; BONDIOLI, A.; SIRTORI, C. R.; TREMOLI, E. Carotid artery intima-media thickness measured by ultrasonography in normal clinical practice correlates well with atherosclerosis risk factors. *Stroke*, 31: 2426-30, 2000a.

BALDASSARRE, D.; TREMOLI, E.; AMATO, M.; VEGLIA, F.; BONDIOLI, A.; SIRTORI, C. R. Reproducibility validation study comparing analog and digital imaging technologies for the measurement of intima-media thickness. *Stroke*, 31: 1104-10, 2000b.

BANE, C.; HUGHES, C. M.; MCELNAY, J. C. The impact of depressive symptoms and psychosocial factors on medication adherence in cardiovascular disease. *Patient Educ Couns*, 60: 187-93, 2006.

BANG, L. E.; BUTTENSCHON, L.; KRISTENSEN, K. S.; SVENDSEN, T. L. Do we undertreat hypertensive smokers? A comparison between smoking and non-smoking hypertensives. *Blood Press Monit*, 5: 271-4, 2000.

BARLEY, J.; BLACKWOOD, A.; MILLER, M.; MARKANDU, N. D.; CARTER, N. D.; JEFFERY, S. et al. Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism, blood pressure and the renin-angiotensin system in Caucasian and Afro-Caribbean peoples. *J Hum Hypertens*, 10: 31-5, 1996.

BARLEY, J.; BLACKWOOD, A.; SAGNELLA, G.; MARKANDU, N.; MACGREGOR, G.; CARTER, N. Angiotensinogen Met235-->Thr polymorphism in a London normotensive and hypertensive black and white population. *J Hum Hypertens*, 8: 639-40, 1994.

BASSENGE, E.; MUNZEL, T. Consideration of conduit and resistance vessels in regulation of blood flow. *Am J Cardiol*, 62: 40E-4E, 1988.

BEEVERS, G.; LIP, G. Y.; O'BRIEN, E. ABC of hypertension. Blood pressure measurement. Part I-sphygmomanometry: factors common to all techniques. *Bmj*, 322: 981-5, 2001a.

BEEVERS, G.; LIP, G. Y.; O'BRIEN, E. ABC of hypertension: Blood pressure measurement. Part II-conventional sphygmomanometry: technique of auscultatory blood pressure measurement. *Bmj*, 322: 1043-7, 2001b.

BEN-ARI, E. T.; LYNCH, K. R.; GARRISON, J. C. Glucocorticoids induce the accumulation of novel angiotensinogen gene transcripts. *J Biol Chem*, 264: 13074-9, 1989.

BENJAFIELD, A. V.; MORRIS, B. J. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am J Hypertens*, 13: 994-8, 2000.

BENOWITZ, N. L.; HANSSON, A.; JACOB, P., 3RD. Cardiovascular effects of nasal and transdermal nicotine and cigarette smoking. *Hypertension*, 39: 1107-12, 2002.

BENOWITZ, N. L.; JACOB, P., 3RD. Daily intake of nicotine during cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther*, 35: 499-504, 1984.

BERGE, K. E.; BERG, K. Polymorphisms at the angiotensinogen (AGT) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) loci and normal blood pressure. *Clin Genet*, 53: 214-9, 1998.

BIRON, P.; MONGEAU, J. G.; BERTRAND, D. Blood pressure values in 1116 French-Canadian children. *Can Med Assoc J*, 114: 432, 1976.

BLOEM, L. J.; MANATUNGA, A. K.; PRATT, J. H. Racial difference in the relationship of an angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin I-converting enzyme activity. *Hypertension*, 27: 62-6, 1996.

BONNARDEAUX, A.; NADAUD, S.; CHARRU, A.; JEUNEMAITRE, X.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation*, 91: 96-102, 1995.

BORECKI, I. B.; PROVINCE, M. A.; LUDWIG, E. H.; ELLISON, R. C.; FOLSOM, A. R.; HEISS, G. et al. Associations of candidate loci angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme with severe hypertension: The NHLBI Family Heart Study. *Ann Epidemiol*, 7: 13-21, 1997.

BOTS, M. L.; HOES, A. W.; KOUDSTAAL, P. J.; HOFMAN, A.; GROBBEE, D. E. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*, 96: 1432-7, 1997.

BOULANGER, C. M. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 31: 39-49, 1999.

BRAND, E.; CHATELAIN, N.; KEAVNEY, B.; CAULFIELD, M.; CITTERIO, L.; CONNELL, J. et al. Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension: a European study. *Hypertension*, 31: 725-9, 1998.

BRASIER, A. R.; PHILIPPE, J.; CAMPBELL, D. J.; HABENER, J. F. Glucocorticoid and thyroid hormone regulation of angiotensinogen gene expression in a pancreatic islet cell line. *Trans Assoc Am Physicians*, 99: 13-9, 1986.

BRAVO, E. L. Phenylpropanolamine and other over-the-counter vasoactive compounds. *Hypertension*, 11: II7-10, 1988.

BRAVO, E. L. Pheochromocytoma: an approach to antihypertensive management. *Ann N Y Acad Sci*, 970: 1-10, 2002.

BRECKLIN, C. S.; GOPANIUK-FOLGA, A.; KRAVETZ, T.; SABAH, S.; SINGH, A.; ARRUDA, J. A. et al. Prevalence of hypertension in chronic cocaine users. *Am J Hypertens*, 11: 1279-83, 1998.

BURKE, G. L.; EVANS, G. W.; RILEY, W. A.; SHARRETT, A. R.; HOWARD, G.; BARNES, R. W. et al. Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Stroke*, 26: 386-91, 1995.

CALDWELL, P. R.; SEEGAL, B. C.; HSU, K. C.; DAS, M.; SOFFER, R. L. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science*, 191: 1050-1, 1976.

CALHOUN, D. A.; ZAMAN, M. A.; NISHIZAKA, M. K. Resistant hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 4: 221-8, 2002.

CAMBIEN, F.; ALHENC-GELAS, F.; HERBETH, B.; ANDRE, J. L.; RAKOTOVAO, R.; GONZALES, M. F. et al. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy Study. *Am J Hum Genet*, 43: 774-80, 1988.

CAMBIEN, F.; COSTEROUSSE, O.; TIRET, L.; POIRIER, O.; LECERF, L.; GONZALES, M. F. et al. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation*, 90: 669-76, 1994.

CAMBIEN, F.; POIRIER, O.; LECERF, L.; EVANS, A.; CAMBOU, J. P.; ARVEILER, D. et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*, 359: 641-4, 1992.

CAMPBELL, D. J.; HABENER, J. F. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*, 78: 31-9, 1986.

CAREY, R. M.; WANG, Z. Q.; SIRAGY, H. M. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*, 35: 155-63, 2000.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*, 101: 329-35, 2000.

CAULFIELD, M.; LAVENDER, P.; FARRALL, M.; MUNROE, P.; LAWSON, M.; TURNER, P. et al. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Engl J Med*, 330: 1629-33, 1994.

CAULFIELD, M.; LAVENDER, P.; NEWELL-PRICE, J.; KAMDAR, S.; FARRALL, M.; CLARK, A. J. Angiotensinogen in human essential hypertension. *Hypertension*, 28: 1123-5, 1996.

CELERMAJER, D. S.; SORENSEN, K. E.; BULL, C.; ROBINSON, J.; DEANFIELD, J. E. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*, 24: 1468-74, 1994a.

CELERMAJER, D. S.; SORENSEN, K. E.; GEORGAKOPOULOS, D.; BULL, C.; THOMAS, O.; ROBINSON, J. et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*, 88: 2149-55, 1993.

CELERMAJER, D. S.; SORENSEN, K. E.; GOOCH, V. M.; SPIEGELHALTER, D. J.; MILLER, O. I.; SULLIVAN, I. D. et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 340: 1111-5, 1992.

CELERMAJER, D. S.; SORENSEN, K. E.; SPIEGELHALTER, D. J.; GEORGAKOPOULOS, D.; ROBINSON, J.; DEANFIELD, J. E. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol*, 24: 471-6, 1994b.

CERVENKA, L.; HORACEK, V.; VANECKOVA, I.; HUBACEK, J. A.; OLIVERIO, M. I.; COFFMAN, T. M. et al. Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension*, 40: 735-41, 2002.

CHARBONNEAU, F.; ANDERSON, T. J. Effects of antihypertensive agents on endothelial dysfunction: rationale for the brachial artery normalization of forearm function study. *Am J Cardiol*, 82: 34S-6S, 1998.

CHEN, W.; SRINIVASAN, S. R.; BOND, M. G.; TANG, R.; URBINA, E. M.; LI, S. et al. Nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) influences arterial stiffness in adults: The Bogalusa Heart Study. *Am J Hypertens*, 17: 553-9, 2004.

CHEN, W.; SRINIVASAN, S. R.; ELKASABANY, A.; ELLSWORTH, D. L.; BOERWINKLE, E.; BERENSON, G. S. Combined effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and insulin resistance status on blood pressure and familial risk of hypertension in young adults: the Bogalusa Heart Study. *Am J Hypertens*, 14: 1046-52, 2001.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, J. L., JR. et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama*, 289: 2560-72, 2003.

COHEN, R. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*, 92: 3337-49, 1995.

COOKE, J. P.; DZAU, V. J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*, 48: 489-509, 1997.

CORRETTI, M. C.; ANDERSON, T. J.; BENJAMIN, E. J.; CELERMAJER, D.; CHARBONNEAU, F.; CREAGER, M. A. et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*, 39: 257-65, 2002.

CORVOL, P.; JEUNEMAITRE, X.; CHARRU, A.; KOTELEVTSSEV, Y.; SOUBRIER, F. Role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation and in human hypertension: new insights from molecular genetics. *Recent Prog Horm Res*, 50: 287-308, 1995.

CREAGER, M. A.; RODDY, M. A. Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. *Hypertension*, 24: 499-505, 1994.

CUSHMAN, W. C. Alcohol consumption and hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 3: 166-70, 2001.

CUTLER, J. A. High blood pressure and end-organ damage. *J Hypertens Suppl*, 14: S3-6, 1996.

DANSER, A. H.; SARIS, J. J.; SCHUIJT, M. P.; VAN KATS, J. P. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovasc Res*, 44: 252-65, 1999.

DANSER, A. H.; SCHALEKAMP, M. A.; BAX, W. A.; VAN DEN BRINK, A. M.; SAXENA, P. R.; RIEGGER, G. A. et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation*, 92: 1387-8, 1995.

DATTILO, J. B.; MAKHOUL, R. G. The role of nitric oxide in vascular biology and pathobiology. *Ann Vasc Surg*, 11: 307-14, 1997.

DAVIS, G. K.; ROBERTS, D. H. Molecular genetics of the renin-angiotensin system: implications for angiotensin II receptor blockade. *Pharmacol Ther*, 75: 43-50, 1997.

DE ARTINANO, A. A.; GONZALEZ, V. L. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharmacol Res*, 40: 113-24, 1999.

DE CATERINA, R. Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 11: 9-23, 2000.

DE LOLIO, C. A. [Prevalence of arterial hypertension in Araraquara, Brazil]. *Arq Bras Cardiol*, 55: 167-73, 1990.

DEREBECKA, N.; HOLYSZ, M.; DANKOWSKI, R.; WIERZCHOWIECKI, M.; TRZECIAK, W. H. Polymorphism in intron 23 of the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) is not associated with hypertension. *Acta Biochim Pol*, 49: 263-8, 2002.

DEVEREUX, R. B.; ALONSO, D. R.; LUTAS, E. M.; GOTTLIEB, G. J.; CAMPO, E.; SACHS, I. et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol*, 57: 450-8, 1986.

DINERMAN, J. L.; DAWSON, T. M.; SCHELL, M. J.; SNOWMAN, A.; SNYDER, S. H. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 4214-8, 1994.

DONG, W.; COLHOUN, H. M.; POULTER, N. R. Blood pressure in women using oral contraceptives: results from the Health Survey for England 1994. *J Hypertens*, 15: 1063-8, 1997.

DREXLER, H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis*, 39: 287-324, 1997.

DREXLER, H.; HORNIG, B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol*, 31: 51-60, 1999.

DUNN, R. W.; REED, T. A.; COPELAND, P. D.; FRYE, C. A. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacology*, 37: 899-904, 1998.

DURU, K.; FARROW, S.; WANG, J. M.; LOCKETTE, W.; KURTZ, T. Frequency of a deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is increased in African-Americans with hypertension. *Am J Hypertens*, 7: 759-62, 1994.

DZAU, V. J. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol*, 59: 59A-65A, 1987.

ELPHICK, M.; RAYNE, R.; RIVEROS-MORENO, V. V.; MONCADA, S.; SHEA, M. Nitric oxide synthesis in locust olfactory interneurons. *J Exp Biol*, 198: 821-9, 1995.

ERDOS, E. G.; SKIDGEL, R. A. Structure and functions of human angiotensin I converting enzyme (kininase II). *Biochem Soc Trans*, 13: 42-4, 1985.

ERNST, M. E.; BERGUS, G. R. Noninvasive 24-hour ambulatory blood pressure monitoring: overview of technology and clinical applications. *Pharmacotherapy*, 22: 597-612, 2002.

ESLER, M. D.; LAMBERT, G. W.; FERRIER, C.; KAYE, D. M.; WALLIN, B. G.; KALFF, V. et al. Central nervous system noradrenergic control of sympathetic outflow in normotensive and hypertensive humans. *Clin Exp Hypertens*, 17: 409-23, 1995.

- FAIRCHILD, T. A.; FULTON, D.; FONTANA, J. T.; GRATTON, J. P.; MCCABE, T. J.; SESSA, W. C. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 276: 26674-9, 2001.
- FEINLEIB, M.; GARRISON, R. J.; FABSITZ, R.; CHRISTIAN, J. C.; HRUBEC, Z.; BORHANI, N. O. et al. The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results. *Am J Epidemiol*, 106: 284-5, 1977.
- FERRO, C. J.; WEBB, D. J. Endothelial dysfunction and hypertension. *Drugs*, 53 Suppl 1: 30-41, 1997.
- FORNAGE, M.; AMOS, C. I.; KARDIA, S.; SING, C. F.; TURNER, S. T.; BOERWINKLE, E. Variation in the region of the angiotensin-converting enzyme gene influences interindividual differences in blood pressure levels in young white males. *Circulation*, 97: 1773-9, 1998.
- FORNAGE, M.; TURNER, S. T.; SING, C. F.; BOERWINKLE, E. Variation at the M235T locus of the angiotensinogen gene and essential hypertension: a population-based case-control study from Rochester, Minnesota. *Hum Genet*, 96: 295-300, 1995.
- FORSTERMANN, U.; BOISSEL, J. P.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Faseb J*, 12: 773-90, 1998.
- FORTE, P.; COPLAND, M.; SMITH, L. M.; MILNE, E.; SUTHERLAND, J.; BENJAMIN, N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet*, 349: 837-42, 1997.
- FOY, C. A.; MCCORMACK, L. J.; KNOWLER, W. C.; BARRETT, J. H.; CATTO, A.; GRANT, P. J. The angiotensin-I converting enzyme (ACE) gene I/D polymorphism and ACE levels in Pima Indians. *J Med Genet*, 33: 336-7, 1996.
- FREITAS, O. C.; RESENDE DE CARVALHO, F.; MARQUES NEVES, J.; VELUDO, P. K.; SILVA PARREIRA, R.; MARAFIOTTI GONCALVES, R. et al. Prevalence of hypertension in the urban population of Catanduva, in the State of Sao Paulo, Brazil. *Arq Bras Cardiol*, 77: 9-21, 2001.

FROHLICH, E. D. Classification of resistant hypertension. *Hypertension*, 11: II67-70, 1988.

FUCHS, F. D.; MOREIRA, L. B.; MORAES, R. S.; BREDEMEIER, M.; CARDOZO, S. C. [Prevalence of systemic arterial hypertension and associated risk factors in the Porto Alegre metropolitan area. Populational-based study]. *Arq Bras Cardiol*, 63: 473-9, 1994.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-6, 1980.

GARCIA-CARDENA, G.; MARTASEK, P.; MASTERS, B. S.; SKIDD, P. M.; COUET, J.; LI, S. et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem*, 272: 25437-40, 1997.

GARG, J. P.; ELLIOTT, W. J.; FOLKER, A.; IZHAR, M.; BLACK, H. R. Resistant hypertension revisited: a comparison of two university-based cohorts. *Am J Hypertens*, 18: 619-26, 2005.

GAVRAS, H. P. Issues in hypertension: drug tolerability and special populations. *Am J Hypertens*, 14: 231S-6S, 2001.

GHOSH, D. K.; ABU-SOUD, H. M.; STUEHR, D. J. Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase. *Biochemistry*, 34: 11316-20, 1995.

GIBBONS, G. H. The pathophysiology of hypertension: the importance of angiotensin II in cardiovascular remodeling. *Am J Hypertens*, 11: 177S-81S, 1998.

GIFFORD, R. W., JR. An algorithm for the management of resistant hypertension. *Hypertension*, 11: II101-5, 1988a.

GIFFORD, R. W., JR. Resistant hypertension. Introduction and definitions. *Hypertension*, 11: II65-6, 1988b.

GIMBRONE, M. A., JR. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 82: 722-6, 1999.

GIMBRONE, M. A., JR.; NAGEL, T.; TOPPER, J. N. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest*, 99: 1809-13, 1997.

GINER, V.; CORELLA, D.; CHAVES, F. J.; PASCUAL, J. M.; PORTOLES, O.; MARIN, P. et al. [Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and essential hypertension in the Spanish population]. *Med Clin (Barc)*, 117: 525-9, 2001.

GIORDANO, A.; TONELLO, C.; BULBARELLI, A.; COZZI, V.; CINTI, S.; CARRUBA, M. O. et al. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Lett*, 514: 135-40, 2002.

GOLDBLATT, H. Hypertension of Renal Origin. Historical and Experimental Background. *Am J Surg*, 107: 21-5, 1964.

GOLSER, R.; GORREN, A. C.; MAYER, B.; SCHMIDT, K. Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system. *Nitric Oxide*, 8: 7-14, 2003.

GRUETTER, C. A.; RYAN, E. T.; LEMKE, S. M.; BAILLY, D. A.; FOX, M. K.; SCHOEPP, D. D. Endothelium-dependent modulation of angiotensin II-induced contraction in blood vessels. *Eur J Pharmacol*, 146: 85-95, 1988.

GUIMARAES, J. I.; GOMES, M. A.; MION, D., JR.; NOBRE, F.; MENDONCA, M. A.; CRUZ, L. L. et al. [Standardization of equipments and techniques for exams of ambulatory blood pressure mapping and home blood pressure monitoring]. *Arq Bras Cardiol*, 80: 225-33, 2003.

GUSTINCICH, S.; MANFIOLETTI, G.; DEL SAL, G.; SCHNEIDER, C.; CARNINCI, P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*, 11: 298-300, 2, 1991.

HALIMI, J. M.; GIRAUDEAU, B.; VOL, S.; CACES, E.; NIVET, H.; TICHET, J. The risk of hypertension in men: direct and indirect effects of chronic smoking. *J Hypertens*, 20: 187-93, 2002.

HALL, J. E. Mechanisms of abnormal renal sodium handling in obesity hypertension. *Am J Hypertens*, 10: 49S-55S, 1997.

HALL, J. E.; HILDEBRANDT, D. A.; KUO, J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am J Hypertens*, 14: 103S-15S, 2001.

HALL, J. E.; SUMMERS, R. L.; BRANDS, M. W.; KEEN, H.; ALONSO-GALICIA, M. Resistance to metabolic actions of insulin and its role in hypertension. *Am J Hypertens*, 7: 772-88, 1994.

HARRAP, S. B. Hypertension: genes versus environment. *Lancet*, 344: 169-71, 1994.

HATA, A.; NAMIKAWA, C.; SASAKI, M.; SATO, K.; NAKAMURA, T.; TAMURA, K. et al. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin Invest*, 93: 1285-7, 1994.

HATAE, T.; TAKIMOTO, E.; MURAKAMI, K.; FUKAMIZU, A. Comparative studies on species-specific reactivity between renin and angiotensinogen. *Mol Cell Biochem*, 131: 43-7, 1994.

HECKER, M.; MULSCH, A.; BASSENGE, E.; FORSTERMANN, U.; BUSSE, R. Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications. *Biochem J*, 299 (Pt 1): 247-52, 1994.

HEGELE, R. A.; BRUNT, J. H.; CONNELLY, P. W. A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure in a genetic isolate. *Circulation*, 90: 2207-12, 1994.

HEGELE, R. A.; BRUNT, J. H.; CONNELLY, P. W. Genetic and biochemical factors associated with variation in blood pressure in a genetic isolate. *Hypertension*, 27: 308-12, 1996.

HINGORANI, A. D.; SHARMA, P.; JIA, H.; HOPPER, R.; BROWN, M. J. Blood pressure and the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene. *Hypertension*, 28: 907-11, 1996.

HINSHAW, J. E. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16: 483-519, 2000.

HIRATA, K.; KURODA, R.; SAKODA, T.; KATAYAMA, M.; INOUE, N.; SUEMATSU, M. et al. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. *Hypertension*, 25: 180-5, 1995.

HIRATA, M.; MURAD, F. Interrelationships of cyclic GMP, inositol phosphates, and calcium. *Adv Pharmacol*, 26: 195-216, 1994.

HIROOKA, Y.; IMAIZUMI, T.; MASAKI, H.; ANDO, S.; HARADA, S.; MOMOHARA, M. et al. Captopril improves impaired endothelium-dependent vasodilation in hypertensive patients. *Hypertension*, 20: 175-80, 1992.

HOFFMANN, A.; GLOE, T.; POHL, U. Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J Cell Physiol*, 188: 33-44, 2001.

HOLLANDER, M.; HAK, A. E.; KOUDSTAAL, P. J.; BOTS, M. L.; GROBBEE, D. E.; HOFMAN, A. et al. Comparison between measures of atherosclerosis and risk of stroke: the Rotterdam Study. *Stroke*, 34: 2367-72, 2003.

HORWITZ, R. I.; HORWITZ, S. M. Adherence to treatment and health outcomes. *Arch Intern Med*, 153: 1863-8, 1993.

HYNDMAN, M. E.; PARSONS, H. G.; VERMA, S.; BRIDGE, P. J.; EDWORTHY, S.; JONES, C. et al. The T-786-->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension*, 39: 919-22, 2002.

IGNARRO, L. J. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by porphyrins and metalloporphyrins. *Adv Pharmacol*, 26: 35-65, 1994.

IYAMA, K.; NAGANO, M.; YO, Y.; NAGANO, N.; KAMIDE, K.; HIGAKI, J. et al. Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. *Am Heart J*, 132: 779-82, 1996.

ISO, H.; HARADA, S.; SHIMAMOTO, T.; SATO, S.; KITAMURA, A.; SANKAI, T. et al. Angiotensinogen T174M and M235T variants, sodium intake and hypertension among non-drinking, lean Japanese men and women. *J Hypertens*, 18: 1197-206, 2000.

IWAI, N.; SHIMOIKE, H.; OHMICH, N.; KINOSHITA, M. Angiotensinogen gene and blood pressure in the Japanese population. *Hypertension*, 25: 688-93, 1995.

JACHYMOVA, M.; HORKY, K.; BULTAS, J.; KOZICH, V.; JINDRA, A.; PELESKA, J. et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 284: 426-30, 2001.

JEUNEMAITRE, X.; CHARRU, A.; CHATELLIER, G.; DUMONT, C.; SASSANO, P.; SOUBRIER, F. et al. M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. *J Hypertens Suppl*, 11: S80-1, 1993.

JEUNEMAITRE, X.; INOUE, I.; WILLIAMS, C.; CHARRU, A.; TICHET, J.; POWERS, M. et al. Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. *Am J Hum Genet*, 60: 1448-60, 1997.

JEUNEMAITRE, X.; LIFTON, R. P.; HUNT, S. C.; WILLIAMS, R. R.; LALOUEL, J. M. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet*, 1: 72-5, 1992.

JIA, C. Q.; ZHAO, Z. T.; WANG, L. H.; HAO, F. R.; FENG, Y. Q.; WANG, S. M. et al. [Effects of G894T mutation in the endothelial nitric oxide synthase gene on blood pressure]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 24: 36-9, 2003.

JOANNIDES, R.; HAEFELI, W. E.; LINDER, L.; RICHARD, V.; BAKKALI, E. H.; THUILLER, C. et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*, 91: 1314-9, 1995.

JOHNSTON, C. I. Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs*, 39 Suppl 1: 21-31, 1990.

KAJIYAMA, N.; SAITO, Y.; MIYAMOTO, Y.; YOSHIMURA, M.; NAKAYAMA, M.; HARADA, M. et al. Lack of association between T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and essential hypertension. *Hypertens Res*, 23: 561-5, 2000.

KAMITANI, A.; RAKUGI, H.; HIGAKI, J.; YI, Z.; MIKAMI, H.; MIKI, T. et al. Association analysis of a polymorphism of the angiotensinogen gene with essential hypertension in Japanese. *J Hum Hypertens*, 8: 521-4, 1994.

KANAI, A. J.; STRAUSS, H. C.; TRUSKEY, G. A.; CREWS, A. L.; GRUNFELD, S.; MALINSKI, T. Shear stress induces ATP-independent transient nitric oxide release from vascular endothelial cells, measured directly with a porphyrinic microsensor. *Circ Res*, 77: 284-93, 1995.

KANNEL, W. B. Hypertension as a risk factor for cardiac events--epidemiologic results of long-term studies. *J Cardiovasc Pharmacol*, 21 Suppl 2: S27-37, 1993.

KANNEL, W. B. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *Jama*, 275: 1571-6, 1996.

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.

KAPLAN, N. M. Resistant hypertension: what to do after trying 'the usual'. *Geriatrics*, 50: 24-5, 9-30; 3 passim, 1995.

KAPLAN, N. M. Resistant hypertension. *J Hypertens*, 23: 1441-4, 2005.

KARVONEN, J.; KAUMA, H.; KERVINEN, K.; RANTALA, M.; IKAHEIMO, M.; PAIVANSALO, M. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and blood pressure, left ventricular mass and carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort. *J Intern Med*, 251: 102-10, 2002.

KATO, N.; SUGIYAMA, T.; MORITA, H.; NABIKA, T.; KURIHARA, H.; YAMORI, Y. et al. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension*, 33: 933-6, 1999.

KIELY, J. M.; CYBULSKY, M. I.; LUSCINSKAS, F. W.; GIMBRONE, M. A., JR. Immunoselective targeting of an anti-thrombin agent to the surface of cytokine-activated vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15: 1211-8, 1995.

KIM, F.; GALLIS, B.; CORSON, M. A. TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C1057-65, 2001.

KIM, H. S.; KREGE, J. H.; KLUCKMAN, K. D.; HAGAMAN, J. R.; HODGIN, J. B.; BEST, C. F. et al. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 2735-9, 1995.

KISHIMOTO, T.; MISAWA, Y.; KAETU, A.; NAGAI, M.; OSAKI, Y.; OKAMOTO, M. et al. eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese. *Prev Med*, 39: 927-31, 2004.

KLATT, P.; SCHMIDT, K.; WERNER, E. R.; MAYER, B. Determination of nitric oxide synthase cofactors: heme, FAD, FMN, and tetrahydrobiopterin. *Methods Enzymol*, 268: 358-65, 1996.

KLONER, R. A.; TEXTOR, S. C.; TAVEL, M. E. Renovascular hypertension: problems in evaluation and management. *Chest*, 121: 964-8, 2002.

KNOWLES, R. G.; MERRETT, M.; SALTER, M.; MONCADA, S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J*, 270: 833-6, 1990.

KOBZIK, L.; BREDET, D. S.; LOWENSTEIN, C. J.; DRAZEN, J.; GASTON, B.; SUGARBAKER, D. et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 9: 371-7, 1993.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 4651-5, 1991.

KUNZ, R.; KREUTZ, R.; BEIGE, J.; DISTLER, A.; SHARMA, A. M. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal. *Hypertension*, 30: 1331-7, 1997.

KURLAND, L.; MELHUS, H.; SARABI, M.; MILLGARD, J.; LJUNGHALL, S.; LIND, L. Polymorphisms in the renin-angiotensin system and endothelium-dependent vasodilation in normotensive subjects. *Clin Physiol*, 21: 343-9, 2001.

LACOLLEY, P.; GAUTIER, S.; POIRIER, O.; PANNIER, B.; CAMBIEN, F.; BENETOS, A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens*, 16: 31-5, 1998.

LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. K.; TEMPST, P.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 6348-52, 1992.

LANDAR, A.; DARLEY-USMAR, V. M. Nitric oxide and cell signaling: modulation of redox tone and protein modification. *Amino Acids*, 25: 313-21, 2003.

LANGE, R. A.; CIGARROA, R. G.; FLORES, E. D.; MCBRIDE, W.; KIM, A. S.; WELLS, P. J. et al. Potentiation of cocaine-induced coronary vasoconstriction by beta-adrenergic blockade. *Ann Intern Med*, 112: 897-903, 1990.

LAPU-BULA, R.; QUARSHIE, A.; LYN, D.; ODUWOLE, A.; PACK, C.; MORGAN, J. et al. The 894T allele of endothelial nitric oxide synthase gene is related to left ventricular mass in African Americans with high-normal blood pressure. *J Natl Med Assoc*, 97: 197-205, 2005.

LARAGH, J. Laragh's lessons in pathophysiology and clinical pearls for treating hypertension. *Am J Hypertens*, 14: 491-503, 2001.

LEBER, A.; HEMMENS, B.; KLOSCH, B.; GOESSLER, W.; RABER, G.; MAYER, B. et al. Characterization of recombinant human endothelial nitric-oxide synthase purified from the yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem*, 274: 37658-64, 1999.

LESHEM, S.; COHEN-LULAV, H.; DI-CASTRO, N.; TABENKIN, H.; STEINMETZ, D. [The frequency and causes of resistant hypertension in primary care practices in the community as compared to those in the district advisory clinic for hypertension]. *Harefuah*, 141: 673-6, 764, 2002.

LEVY, D.; GARRISON, R. J.; SAVAGE, D. D.; KANNEL, W. B.; CASTELLI, W. P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*, 322: 1561-6, 1990.

LEVY, D.; MURABITO, J. M.; ANDERSON, K. M.; CHRISTIANSEN, J. C.; CASTELLI, W. P. Echocardiographic left ventricular hypertrophy: clinical characteristics. The Framingham Heart Study. *Clin Exp Hypertens A*, 14: 85-97, 1992.

LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; COLLINS, R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*, 360: 1903-13, 2002.

LI, J.; ZHAO, S. P.; LI, X. P.; ZHUO, Q. C.; GAO, M.; LU, S. K. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol*, 61: 165-9, 1997.

LI, R.; LYN, D.; LAPU-BULA, R.; ODUWOLE, A.; IGHO-PEMU, P.; LANKFORD, B. et al. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens*, 17: 560-7, 2004.

LIFTON, R. P. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science*, 272: 676-80, 1996.

LIFTON, R. P.; DLUHY, R. G.; POWERS, M.; RICH, G. M.; COOK, S.; ULICK, S. et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature*, 355: 262-5, 1992.

LIFTON, R. P.; GHARAVI, A. G.; GELLER, D. S. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*, 104: 545-56, 2001.

LINDPAINTNER, K.; PFEFFER, M. A.; KREUTZ, R.; STAMPFER, M. J.; GRODSTEIN, F.; LAMOTTE, F. et al. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med*, 332: 706-11, 1995.

LIST, B. M.; KLOSCH, B.; VOLKER, C.; GORREN, A. C.; SESSA, W. C.; WERNER, E. R. et al. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J*, 323 (Pt 1): 159-65, 1997.

LONGINI, I. M., JR.; HIGGINS, M. W.; HINTON, P. C.; MOLL, P. P.; KELLER, J. B. Environmental and genetic sources of familial aggregation of blood pressure in Tecumseh, Michigan. *Am J Epidemiol*, 120: 131-44, 1984.

LONN, E. Modifying the natural history of atherosclerosis: the SECURE trial. *Int J Clin Pract Suppl*: 13-8, 2001.

LONN, E.; YUSUF, S.; DZAVIK, V.; DORIS, C.; YI, Q.; SMITH, S. et al. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation*, 103: 919-25, 2001.

LORENZO, O.; RUIZ-ORTEGA, M.; SUZUKI, Y.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; SUGAYA, T. et al. Angiotensin III activates nuclear transcription factor-kappaB in cultured mesangial cells mainly via AT(2) receptors: studies with AT(1) receptor-knockout mice. *J Am Soc Nephrol*, 13: 1162-71, 2002.

LUBIANCA, J. N.; FACCIN, C. S.; FUCHS, F. D. Oral contraceptives: a risk factor for uncontrolled blood pressure among hypertensive women. *Contraception*, 67: 19-24, 2003.

LUFT, F. C. Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens*, 16: 1871-8, 1998.

LUSCHER, T. F.; BARTON, M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*, 20: II-3-10, 1997.

- MALIK, F. S.; LAVIE, C. J.; MEHRA, M. R.; MILANI, R. V.; RE, R. N. Renin-angiotensin system: genes to bedside. *Am Heart J*, 134: 514-26, 1997.
- MANCIA, G.; PARATI, G.; HENNIG, M.; FLATAU, B.; OMBONI, S.; GLAVINA, F. et al. Relation between blood pressure variability and carotid artery damage in hypertension: baseline data from the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA). *J Hypertens*, 19: 1981-9, 2001.
- MARSDEN, P. A.; HENG, H. H.; SCHERER, S. W.; STEWART, R. J.; HALL, A. V.; SHI, X. M. et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 268: 17478-88, 1993.
- MATERSON, B. J.; REDA, D.; FREIS, E. D.; HENDERSON, W. G. Cigarette smoking interferes with treatment of hypertension. *Arch Intern Med*, 148: 2116-9, 1988.
- MATHEW, J.; BASHEERUDDIN, K.; PRABHAKAR, S. Differences in frequency of the deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in different ethnic groups. *Angiology*, 52: 375-9, 2001.
- MATSUI, D.; HERMANN, C.; KLEIN, J.; BERKOVITCH, M.; OLIVIERI, N.; KOREN, G. Critical comparison of novel and existing methods of compliance assessment during a clinical trial of an oral iron chelator. *J Clin Pharmacol*, 34: 944-9, 1994.
- MESSERLI, F. H.; VENTURA, H. O.; AMODEO, C. Osler's maneuver and pseudohypertension. *N Engl J Med*, 312: 1548-51, 1985.
- MININO, A. M.; ARIAS, E.; KOCHANKE, K. D.; MURPHY, S. L.; SMITH, B. L. Deaths: final data for 2000. *Natl Vital Stat Rep*, 50: 1-119, 2002.
- MIYAHARA, K.; KAWAMOTO, T.; SASE, K.; YUI, Y.; TODA, K.; YANG, L. X. et al. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem*, 223: 719-26, 1994.
- MIYAMOTO, Y.; SAITO, Y.; KAJIYAMA, N.; YOSHIMURA, M.; SHIMASAKI, Y.; NAKAYAMA, M. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*, 32: 3-8, 1998.

MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol*, 31: 61-74, 1999.

MONCADA, S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci*, 811: 60-7; discussion 7-9, 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb J*, 9: 1319-30, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109-42, 1991.

MONDORF, U. F.; RUSS, A.; WIESEMAN, A.; HERRERO, M.; OREMEK, G.; LENZ, T. Contribution of angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and angiotensinogen gene polymorphism to blood pressure regulation in essential hypertension. *Am J Hypertens*, 11: 174-83, 1998.

MORENO, H., JR.; CHALON, S.; URAE, A.; TANGPHAO, O.; ABIOSE, A. K.; HOFFMAN, B. B. et al. Endothelial dysfunction in human hand veins is rapidly reversible after smoking cessation. *Am J Physiol*, 275: H1040-5, 1998.

MORGAN, L.; BROUGHTON PIPKIN, F.; KALSHEKER, N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol*, 28: 1211-22, 1996.

MUNZEL, T.; FEIL, R.; MULSCH, A.; LOHMANN, S. M.; HOFMANN, F.; WALTER, U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation*, 108: 2172-83, 2003.

MURAD, F. Cyclic GMP: synthesis, metabolism, and function. Introduction and some historical comments. *Adv Pharmacol*, 26: 1-5, 1994.

NAKAYAMA, M.; YASUE, H.; YOSHIMURA, M.; SHIMASAKI, Y.; KUGIYAMA, K.; OGAWA, H. et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, 99: 2864-70, 1999.

NAKAYAMA, T.; SOMA, M.; TAKAHASHI, Y.; IZUMI, Y.; KANMATSUSE, K.; ESUMI, M. Association analysis of CA repeat polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. Clin Genet, 51: 26-30, 1997.

NAVAR, L. G.; HARRISON-BERNARD, L. M.; NISHIYAMA, A.; KOBORI, H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. Hypertension, 39: 316-22, 2002.

NEUGEBAUER, S.; BABA, T.; WATANABE, T. Association of the nitric oxide synthase gene polymorphism with an increased risk for progression to diabetic nephropathy in type 2 diabetes. Diabetes, 49: 500-3, 2000.

NEUNTEUFL, T.; MAURER, G. Noninvasive ultrasound techniques for the assessment of atherosclerosis in coronary artery disease. Circ J, 67: 177-86, 2003.

NISHIUMA, S.; KARIO, K.; KAYABA, K.; NAGIO, N.; SHIMADA, K.; MATSUO, T. et al. Effect of the angiotensinogen gene Met235-->Thr variant on blood pressure and other cardiovascular risk factors in two Japanese populations. J Hypertens, 13: 717-22, 1995.

NIU, T.; XU, X.; ROGUS, J.; ZHOU, Y.; CHEN, C.; YANG, J. et al. Angiotensinogen gene and hypertension in Chinese. J Clin Invest, 101: 188-94, 1998.

O'BRIEN, E.; BEEVERS, G.; LIP, G. Y. ABC of hypertension. Blood pressure measurement. Part III-automated sphygmomanometry: ambulatory blood pressure measurement. Bmj, 322: 1110-4, 2001a.

O'BRIEN, E.; BEEVERS, G.; LIP, G. Y. ABC of hypertension: Blood pressure measurement. Part IV-automated sphygmomanometry: self blood pressure measurement. Bmj, 322: 1167-70, 2001b.

O'DONNELL, C. J.; LINDPAINTNER, K.; LARSON, M. G.; RAO, V. S.; ORDOVAS, J. M.; SCHAEFER, E. J. et al. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. Circulation, 97: 1766-72, 1998.

O'LEARY, D. H.; POLAK, J. F.; KRONMAL, R. A.; MANOLIO, T. A.; BURKE, G. L.; WOLFSON, S. K., JR. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. N Engl J Med, 340: 14-22, 1999.

OHISHI, M.; UEDA, M.; RAKUGI, H.; NARUKO, T.; KOJIMA, A.; OKAMURA, A. et al. Enhanced expression of angiotensin-converting enzyme is associated with progression of coronary atherosclerosis in humans. J Hypertens, 15: 1295-302, 1997.

OHKUBO, H.; KAGEYAMA, R.; UJIHARA, M.; HIROSE, T.; INAYAMA, S.; NAKANISHI, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. Proc Natl Acad Sci U S A, 80: 2196-200, 1983.

OLIVEIRA, C. J.; SCHINDLER, F.; VENTURA, A. M.; MORAIS, M. S.; ARAI, R. J.; DEBBAS, V. et al. Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. Free Radic Biol Med, 35: 381-96, 2003.

OPARIL, S.; ZAMAN, M. A.; CALHOUN, D. A. Pathogenesis of hypertension. Ann Intern Med, 139: 761-76, 2003.

PACAK, K.; EISENHOFER, G.; CARRASQUILLO, J. A.; CHEN, C. C.; WHATLEY, M.; GOLDSTEIN, D. S. Diagnostic localization of pheochromocytoma: the coming of age of positron emission tomography. Ann N Y Acad Sci, 970: 170-6, 2002.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature, 333: 664-6, 1988.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, 327: 524-6, 1987.

PANZA, J. A. Endothelial dysfunction in essential hypertension. Clin Cardiol, 20: II-26-33, 1997.

PANZA, J. A.; CASINO, P. R.; KILCOYNE, C. M.; QUYYUMI, A. A. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*, 87: 1468-74, 1993.

PANZA, J. A.; QUYYUMI, A. A.; BRUSH, J. E., JR.; EPSTEIN, S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*, 323: 22-7, 1990.

PARATI, G.; DI RIENZO, M.; ULIAN, L.; SANTUCCIU, C.; GIRARD, A.; ELGHOZI, J. L. et al. Clinical relevance blood pressure variability. *J Hypertens Suppl*, 16: S25-33, 1998.

PEREIRA, A. C.; MOTA, G. A.; BENSENOR, I.; LOTUFO, P. A.; KRIEGER, J. E. Effect of race, genetic population structure, and genetic models in two-locus association studies: clustering of functional renin-angiotensin system gene variants in hypertension association studies. *Braz J Med Biol Res*, 34: 1421-8, 2001.

PEREIRA, A. C.; MOTA, G. F.; CUNHA, R. S.; HERBENHOFF, F. L.; MILL, J. G.; KRIEGER, J. E. Angiotensinogen 235T allele "dosage" is associated with blood pressure phenotypes. *Hypertension*, 41: 25-30, 2003.

PEREIRA, A. C.; SPOSITO, A. C.; MOTA, G. F.; CUNHA, R. S.; HERKENHOFF, F. L.; MILL, J. G. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. *Atherosclerosis*, 184: 193-200, 2006.

PERTICONE, F.; CERAVOLO, R.; MAIO, R.; VENTURA, G.; ZINGONE, A.; PERROTTI, N. et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelium-dependent vasodilation in never treated hypertensive patients. *Hypertension*, 31: 900-5, 1998.

PHILLIPS, M. I. Is gene therapy for hypertension possible? *Hypertension*, 33: 8-13, 1999.

PIGNOLI, P.; LONGO, T. Ultrasound evaluation of atherosclerosis. Methodological problems and technological developments. *Eur Surg Res*, 18: 238-53, 1986.

PIGNOLI, P.; TREMOLI, E.; POLI, A.; ORESTE, P.; PAOLETTI, R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation*, 74: 1399-406, 1986.

POIRIER, O.; MAO, C.; MALLET, C.; NICAUD, V.; HERRMANN, S. M.; EVANS, A. et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest*, 29: 284-90, 1999.

POPE, J. E.; ANDERSON, J. J.; FELSON, D. T. A meta-analysis of the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on blood pressure. *Arch Intern Med*, 153: 477-84, 1993.

PROCOPCIUC, L.; POPESCU, T.; JEBELEANU, G.; POP, D.; ZDRENGHEA, D. Essential arterial hypertension and polymorphism of angiotensinogen M235T gene. *J Cell Mol Med*, 6: 245-50, 2002.

PULKKINEN, A.; VIITANEN, L.; KAREINEN, A.; LEHTO, S.; VAUHKONEN, I.; LAAKSO, M. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with elevated blood pressure in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *J Mol Med*, 78: 372-9, 2000.

QURESHI, A. I.; SURI, M. F.; KIRMANI, J. F.; DIVANI, A. A. Prevalence and trends of prehypertension and hypertension in United States: National Health and Nutrition Examination Surveys 1976 to 2000. *Med Sci Monit*, 11: CR403-9, 2005.

RAIJ, L. Workshop: hypertension and cardiovascular risk factors: role of the angiotensin II-nitric oxide interaction. *Hypertension*, 37: 767-73, 2001.

RAMAN, C. S.; LI, H.; MARTASEK, P.; KRAL, V.; MASTERS, B. S.; POULOS, T. L. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*, 95: 939-50, 1998.

RAMASAMY, S.; PARTHASARATHY, S.; HARRISON, D. G. Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J Lipid Res*, 39: 268-76, 1998.

RAND, C. S. Measuring adherence with therapy for chronic diseases: implications for the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*, 72: 68D-74D, 1993.

RAYNER, B. L. Screening and diagnosis of primary aldosteronism. *Cardiovasc J S Afr*, 13: 166-70, 2002.

REDBERG, R. F.; VOGEL, R. A.; CRIQUI, M. H.; HERRINGTON, D. M.; LIMA, J. A.; ROMAN, M. J. 34th Bethesda Conference: Task force #3--What is the spectrum of current and emerging techniques for the noninvasive measurement of atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol*, 41: 1886-98, 2003.

RIGAT, B.; HUBERT, C.; ALHENC-GELAS, F.; CAMBIEN, F.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 86: 1343-6, 1990.

RILEY, W. A.; BARNES, R. W.; APPLEGATE, W. B.; DEMPSEY, R.; HARTWELL, T.; DAVIS, V. G. et al. Reproducibility of noninvasive ultrasonic measurement of carotid atherosclerosis. The Asymptomatic Carotid Artery Plaque Study. *Stroke*, 23: 1062-8, 1992a.

RILEY, W. A.; BARNES, R. W.; EVANS, G. W.; BURKE, G. L. Ultrasonic measurement of the elastic modulus of the common carotid artery. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Stroke*, 23: 952-6, 1992b.

RIORDAN, J. F. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol*, 4: 225, 2003.

RISCH, N. Linkage strategies for genetically complex traits. III. The effect of marker polymorphism on analysis of affected relative pairs. *Am J Hum Genet*, 46: 242-53, 1990.

RISCH, N. J. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405: 847-56, 2000.

ROCCHINI, A. P. Obesity hypertension. *Am J Hypertens*, 15: 50S-2S, 2002.

RODRIGO, J.; RIVEROS-MORENO, V.; BENTURA, M. L.; UTTENTHAL, L. O.; HIGGS, E. A.; FERNANDEZ, A. P. et al. Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema, and blood vessels of the rat brain. *J Comp Neurol*, 378: 522-34, 1997.

RODRIGUEZ-ESPARRAGON, F.; HERNANDEZ-PERERA, O.; RODRIGUEZ-PEREZ, J. C.; ANABITARTE, A.; DIAZ-CREMADES, J. M.; LOSADA, A. et al. The effect of methylenetetrahydrofolate reductase C677T common variant on hypertensive risk is not solely explained by increased plasma homocysteine values. *Clin Exp Hypertens*, 25: 209-20, 2003.

RODRIGUEZ-PEREZ, J. C.; RODRIGUEZ-ESPARRAGON, F.; HERNANDEZ-PERERA, O.; ANABITARTE, A.; LOSADA, A.; MEDINA, A. et al. Association of angiotensinogen M235T and A(-6)G gene polymorphisms with coronary heart disease with independence of essential hypertension: the PROCAGENE study. *Prospective Cardiac Gene. J Am Coll Cardiol*, 37: 1536-42, 2001.

ROHRWASSER, A.; MORGAN, T.; DILLON, H. F.; ZHAO, L.; CALLAWAY, C. W.; HILLAS, E. et al. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension*, 34: 1265-74, 1999.

ROTIMI, C.; MORRISON, L.; COOPER, R.; OYEJIDE, C.; EFFIONG, E.; LADIPO, M. et al. Angiotensinogen gene in human hypertension. Lack of an association of the 235T allele among African Americans. *Hypertension*, 24: 591-4, 1994.

RUEHLMANN, D. O.; MANN, G. E. Rapid non-genomic vasodilator actions of oestrogens and sex steroids. *Curr Med Chem*, 7: 533-41, 2000.

RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; EGIDO, J. Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. *Kidney Int*, 57: 2285-98, 2000.

RUIZ-ORTEGA, M.; RUPEREZ, M.; LORENZO, O.; ESTEBAN, V.; BLANCO, J.;

MEZZANO, S. et al. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl*, 12-22, 2002.

RYAN, J. W.; RYAN, U. S. Proceedings: Pulmonary endothelial cells/metabolism of vasoactive substances. *Thromb Diath Haemorrh*, 34: 330, 1975.

RYAN, J. W.; RYAN, U. S. Pulmonary endothelial cells. *Fed Proc*, 36: 2683-91, 1977.

SABHA, M.; TANUS-SANTOS, J. E.; TOLEDO, J. C.; CITTADINO, M.; ROCHA, J. C.; MORENO, H., JR. Transdermal nicotine mimics the smoking-induced endothelial dysfunction. *Clin Pharmacol Ther*, 68: 167-74, 2000.

SACHIDANANDAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S. C.; KAKOL, J. M.; STEIN, L. D.; MARTH, G. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409: 928-33, 2001.

SALAZAR, L. A.; HIRATA, M. H.; CAVALLI, S. A.; MACHADO, M. O.; HIRATA, R. D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem*, 44: 1748-50, 1998.

SAMANI, N. J.; SWALES, J. D. Molecular biology of the vascular renin-angiotensin system. *Blood Vessels*, 28: 210-6, 1991.

SASAMURA, H.; HEIN, L.; KRIEGER, J. E.; PRATT, R. E.; KOBILKA, B. K.; DZAU, V. J. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun*, 185: 253-9, 1992.

SAYED-TABATABAEI, F. A.; HOUWING-DUISTERMAAT, J. J.; VAN DUIJN, C. M.; WITTEMAN, J. C. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis. *Stroke*, 34: 1634-9, 2003.

SCHMIDT, S.; VAN HOOFT, I. M.; GROBBEE, D. E.; GANTEN, D.; RITZ, E. Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. *J Hypertens*, 11: 345-8, 1993.

SETHI, A. A.; NORDESTGAARD, B. G.; AGERHOLM-LARSEN, B.; FRANDSEN, E.; JENSEN, G.; TYBJAERG-HANSEN, A. Angiotensinogen polymorphisms and elevated blood pressure in the general population: the Copenhagen City Heart Study. *Hypertension*, 37: 875-81, 2001.

SHIMASAKI, Y.; YASUE, H.; YOSHIMURA, M.; NAKAYAMA, M.; KUGIYAMA, K.; OGAWA, H. et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 31: 1506-10, 1998.

SHIMKETS, R. A.; LIFTON, R. P. Recent advances in the molecular genetics of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 5: 162-5, 1996.

SHIMKETS, R. A.; WARNOCK, D. G.; BOSITIS, C. M.; NELSON-WILLIAMS, C.; HANSSON, J. H.; SCHAMBELAN, M. et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell*, 79: 407-14, 1994.

SHOJI, M.; TSUTAYA, S.; SAITO, R.; TAKAMATU, H.; YASUJIMA, M. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci*, 66: 2557-62, 2000.

SILVERBERG, D. S.; OKSENBERG, A.; IAINA, A. Sleep related breathing disorders are common contributing factors to the production of essential hypertension but are neglected, underdiagnosed, and undertreated. *Am J Hypertens*, 10: 1319-25, 1997.

SIMIONESCU, M.; SIMIONESCU, N. Functions of the endothelial cell surface. *Annu Rev Physiol*, 48: 279-93, 1986.

SIMON, A.; GARIEPY, J.; CHIRONI, G.; MEGNIEN, J. L.; LEVENSON, J. Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. *J Hypertens*, 20: 159-69, 2002.

SIMON, D. B.; KARET, F. E.; HAMDAN, J. M.; DIPIETRO, A.; SANJAD, S. A.; LIFTON, R. P. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet*, 13: 183-8, 1996a.

SIMON, D. B.; KARET, F. E.; RODRIGUEZ-SORIANO, J.; HAMDAN, J. H.; DIPIETRO, A.; TRACHTMAN, H. et al. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet*, 14: 152-6, 1996b.

SIMON, D. B.; NELSON-WILLIAMS, C.; BIA, M. J.; ELLISON, D.; KARET, F. E.; MOLINA, A. M. et al. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet*, 12: 24-30, 1996c.

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.

SKEGGS, L. T., JR.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med*, 103: 295-9, 1956.

SKIDGEL, R. A. Characterization of the metabolism of substance P and neurotensin by human angiotensin I converting enzyme and "enkephalinase". *Prog Clin Biol Res*, 192: 371-8, 1985.

SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 1025-9, 1985.

SMITH, M. L.; NIEDERMAIER, O. N.; HARDY, S. M.; DECKER, M. J.; STROHL, K. P. Role of hypoxemia in sleep apnea-induced sympathoexcitation. *J Auton Nerv Syst*, 56: 184-90, 1996.

SORENSEN, K. E.; CELERMAJER, D. S.; SPIEGELHALTER, D. J.; GEORGAKOPOULOS, D.; ROBINSON, J.; THOMAS, O. et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*, 74: 247-53, 1995.

SOUBRIER, F.; HUBERT, C.; TESTUT, P.; NADAUD, S.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *J Hypertens*, 11: 471-6, 1993a.

SOUBRIER, F.; WEI, L.; HUBERT, C.; CLAUSER, E.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *J Hypertens*, 11: 599-604, 1993b.

STOWASSER, M.; GORDON, R. D.; RUTHERFORD, J. C.; NIKWAN, N. Z.; DAUNT, N.; SLATER, G. J. Diagnosis and management of primary aldosteronism. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2: 156-69, 2001.

SUN, K.; TAKASU, J.; YAMAMOTO, R.; YOKOYAMA, K.; TAGUCHI, R.; ITANI, Y. et al. Assessment of aortic atherosclerosis and carotid atherosclerosis in coronary artery disease. *Jpn Circ J*, 64: 745-9, 2000.

SUNYAEV, S.; RAMENSKY, V.; KOCH, I.; LATHE, W., 3RD; KONDRASHOV, A. S.; BORK, P. Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet*, 10: 591-7, 2001.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SALVETTI, G.; SALVETTI, A. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Nephrol*, 13: 205-10, 2000.

TALER, S. J.; TEXTOR, S. C.; CANZANELLO, V. J.; SCHWARTZ, L. Cyclosporin-induced hypertension: incidence, pathogenesis and management. *Drug Saf*, 20: 437-49, 1999.

TANUS-SANTOS, J. E.; DESAI, M.; FLOCKHART, D. A. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics*, 11: 719-25, 2001.

TAUBMAN, M. B. Angiotensin II: a vasoactive hormone with ever-increasing biological roles. *Circ Res*, 92: 9-11, 2003.

TAYLOR, D. W.; SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B.; JOHNSON, A. L.; GIBSON, E. S.; ROBERTS, R. S. Compliance with antihypertensive drug therapy. *Ann N Y Acad Sci*, 304: 390-403, 1978.

TESAURO, M.; THOMPSON, W. C.; ROGLIANI, P.; QI, L.; CHAUDHARY, P. P.; MOSS, J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 2832-5, 2000.

THADHANI, R.; CAMARGO, C. A., JR.; STAMPFER, M. J.; CURHAN, G. C.; WILLETT, W. C.; RIMM, E. B. Prospective study of moderate alcohol consumption and risk of hypertension in young women. *Arch Intern Med*, 162: 569-74, 2002.

THEUER, J.; DECHEND, R.; MULLER, D. N.; PARK, J. K.; FIEBELER, A.; BARTA, P. et al. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord*, 2: 3, 2002.

TIRET, L.; RIGAT, B.; VISVIKIS, S.; BREDA, C.; CORVOL, P.; CAMBIEN, F. et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet*, 51: 197-205, 1992.

TRAUB, O.; BERK, B. C. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 677-85, 1998.

TSAI, C. T.; FALLIN, D.; CHIANG, F. T.; HWANG, J. J.; LAI, L. P.; HSU, K. L. et al. Angiotensinogen gene haplotype and hypertension: interaction with ACE gene I allele. *Hypertension*, 41: 9-15, 2003.

TSUJITA, Y.; BABA, S.; YAMAUCHI, R.; MANNAMI, T.; KINOSHITA, M.; YAMAMOTO, R. et al. Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: The Suita Study. *J Hypertens*, 19: 1941-8, 2001.

TURNER, S. T.; BOERWINKLE, E.; SING, C. F. Context-dependent associations of the ACE I/D polymorphism with blood pressure. *Hypertension*, 34: 773-8, 1999.

TYKARSKI, A. Resistant hypertension. *Blood Press*, 14 Suppl 2: 42-5, 2005.

UEMATSU, M.; OHARA, Y.; NAVAS, J. P.; NISHIDA, K.; MURPHY, T. J.; ALEXANDER, R. W. et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*, 269: C1371-8, 1995.

UWABO, J.; SOMA, M.; NAKAYAMA, T.; KANMATSUSE, K. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *Am J Hypertens*, 11: 125-8, 1998.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*, 2: 997-1000, 1989.

VANE, J. R.; ANGGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*, 323: 27-36, 1990.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens Suppl*, 14: S83-93, 1996.

VIDT, D. G. Pathogenesis and treatment of resistant hypertension. *Minerva Med*, 94: 201-14, 2003.

VOGEL, R. A. Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol*, 20: 426-32, 1997.

WALPOLA, P. L.; GOTLIEB, A. I.; CYBULSKY, M. I.; LANGILLE, B. L. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15: 2-10, 1995.

WALTHER, M. M. New therapeutic and surgical approaches for sporadic and hereditary pheochromocytoma. *Ann N Y Acad Sci*, 970: 41-53, 2002.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A.; SHENG, H.; MURAD, F. Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation. *Adv Pharmacol*, 26: 171-94, 1994.

WEINER, C. P.; KNOWLES, R. G.; NELSON, S. E.; STEGINK, L. D. Pregnancy increases guanosine 3',5'-monophosphate in the myometrium independent of nitric oxide synthesis. *Endocrinology*, 135: 2473-8, 1994.

WILLIAMS, G. H. Genetic approaches to understanding the pathophysiology of complex human traits. *Kidney Int*, 46: 1550-3, 1994.

WILLIAMS, J. D.; COLES, G. A. Proteinuria--a direct cause of renal morbidity? *Kidney Int*, 45: 443-50, 1994.

WINKELMANN, B. R.; RUSS, A. P.; NAUCK, M.; KLEIN, B.; BOHM, B. O.; MAIER, V. et al. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease. *Am Heart J*, 137: 698-705, 1999.

WOLFF, B.; GRABE, H. J.; SCHLUTER, C.; POPOWSKI, K.; VOLZKE, H.; LUDEMANN, J. et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism, blood pressure and hypertension in a general population sample. *J Hypertens*, 23: 1361-6, 2005.

WU, K. K. Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis. *J Formos Med Assoc*, 95: 661-6, 1996.

WU, K. K.; THIAGARAJAN, P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med*, 47: 315-31, 1996.

WU, X.; LUKE, A.; RIEDER, M.; LEE, K.; TOTH, E. J.; NICKERSON, D. et al. An association study of angiotensinogen polymorphisms with serum level and hypertension in an African-American population. *J Hypertens*, 21: 1847-52, 2003.

XU, W.; CHARLES, I. G.; LIU, L.; KONI, P. A.; MONCADA, S.; EMSON, P. Molecular genetic analysis of the duplication of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) sequences. *Biochem Biophys Res Commun*, 212: 466-72, 1995.

YAKOVLEVITCH, M.; BLACK, H. R. Resistant hypertension in a tertiary care clinic. Arch Intern Med, 151: 1786-92, 1991.

YANG, H. Y.; ERDOS, E. G.; LEVIN, Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. Biochim Biophys Acta, 214: 374-6, 1970.

YOON, Y.; SONG, J.; HONG, S. H.; KIM, J. Q. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. Clin Chem, 46: 1626-30, 2000.

YOSHIMURA, M.; YASUE, H.; NAKAYAMA, M.; SHIMASAKI, Y.; SUMIDA, H.; SUGIYAMA, S. et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. Hum Genet, 103: 65-9, 1998.

YOUNG, W. F., JR. Primary aldosteronism: management issues. Ann N Y Acad Sci, 970: 61-76, 2002.

YUGAR-TOLEDO, J. C.; BONALUME TACITO, L. H.; FERREIRA-MELO, S. E.; SOUSA, W.; CONSOLIN-COLOMBO, F.; IRIGOYEN, M. C. et al. Low-renin (volume dependent) mild-hypertensive patients have impaired flow-mediated and glyceryl-trinitrate stimulated vascular reactivity. Circ J, 69: 1380-5, 2005a.

YUGAR-TOLEDO, J. C.; FERREIRA-MELO, S. E.; SABHA, M.; NOGUEIRA, E. A.; COELHO, O. R.; CONSOLIN COLOMBO, F. M. et al. Blood pressure circadian rhythm and endothelial function in heavy smokers: acute effects of transdermal nicotine. J Clin Hypertens (Greenwich), 7: 721-8, 2005b.

YUGAR-TOLEDO, J. C.; TANUS-SANTOS, J. E.; SABHA, M.; SOUSA, M. G.; CITTADINO, M.; TACITO, L. H. et al. Uncontrolled hypertension, uncompensated type II diabetes, and smoking have different patterns of vascular dysfunction. Chest, 125: 823-30, 2004.

ZAFARI, A. M.; USHIO-FUKAI, M.; AKERS, M.; YIN, Q.; SHAH, A.; HARRISON, D. G. et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. Hypertension, 32: 488-95, 1998.

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

ZEE, R. Y.; LOU, Y. K.; GRIFFITHS, L. R.; MORRIS, B. J. Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*, 184: 9-15, 1992.

ZHOU, M. S.; HERNANDEZ SCHULMAN, I.; PAGANO, P. J.; JAIMES, E. A.; RAIJ, L. Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension: link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure. *Hypertension*, 47: 81-6, 2006.

ZHU, X.; YAN, D.; COOPER, R. S.; LUKE, A.; IKEDA, M. A.; CHANG, Y. P. et al. Linkage disequilibrium and haplotype diversity in the genes of the renin-angiotensin system: findings from the family blood pressure program. *Genome Res*, 13: 173-81, 2003.

ZUSCHKE, C. A.; PETTYJOHN, F. S. Pseudohypertension. *South Med J*, 88: 1185-90, 1995.

ZWEIFLER, A. J.; SHAHAB, S. T. Pseudohypertension: a new assessment. *J Hypertens*, 11: 1-6, 1993.

Capa anexos



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 22/01/02
(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 315/2001

I-IDENTIFICAÇÃO:

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Heitor Moreno Júnior

INSTITUIÇÃO: Departamento de Farmacologia/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/11/2001

II - OBJETIVOS

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

III - SUMÁRIO

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

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

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

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

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

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

V - PARECER DO CEP

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

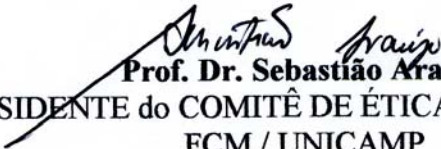
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

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


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

CONSENTIMENTO DOS VOLUNTÁRIOS

HIPERTENSÃO ARTERIAL REFRATÁRIA: caracterização fenotípica, avaliação cardiovascular morfo-funcional e correlação com polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina e de sintase endotelial do óxido nítrico.

DATA____/____/____

CARTA DOS DIREITOS DO VOLUNTÁRIO EM PESQUISA MÉDICA

Os indivíduos que participam da pesquisa médica adquirem certos direitos. Esses 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 possam possivelmente ocorrer ou estarem sujeitos;
- De possíveis benefícios advindos da pesquisa;
- De 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 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 ou testemunha.

Data

CONSENTIMENTO INFORMADO

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

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

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

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

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

NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTES ESTUDOS.

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

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

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

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

Assinatura do voluntário

Data

Assinatura do investigador ou testemunha

**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLAREIDO PARA PESQUISA COM
SERES HUMANOS**

Nome do projeto: Avaliação clínica, funcional e dos polimorfismos genéticos envolvidos na fisiopatologia da hipertensão arterial refratária.

Responsável pela condução das pesquisas: Juan Carlos Yugar Toledo

Nome do paciente: _____

CIC: _____ RG: _____ nº HC: _____

Responsável Legal do paciente: _____

CIC: _____ RG: _____

Grau de parentesco: _____

Endereço: _____

Prova documental: _____

Local: _____ Data ____/____/____

CARTA DOS DIREITOS DO VOLUNTÁRIO EM PESQUISA MÉDICA

Os indivíduos que participam da pesquisa médica adquirem certos direitos. Esses 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 possam possivelmente ocorrer ou estarem sujeitos;
- De possíveis benefícios advindos da pesquisa;
- De 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 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 ou testemunha

Data

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está convidado a participar de um estudo sobre envolvimento dos fatores genéticos e as alterações funcionais do endotélio vascular na hipertensão arterial resistente. Nós estudaremos a influência dos fatores genéticos envolvidos na hipertensão arterial resistente através de pesquisa genética e de biologia molecular em amostras de sangue venoso de 40 ml que serão coletadas para tal finalidade. As alterações funcionais do endotélio vascular serão avaliadas mediante estudos de ultra-sonografia da artéria braquial antes e pós-compressão do braço com manguito de aparelho de pressão, podendo provocar formigamento transitório no braço estudado que cessa imediatamente após o esvaziamento do manguito. Serão também realizados estudos da veia dorsal da mão com a técnica de pesquisa da complacência venosa pela administração local de fenilefrina e bradicinina em dosagens baixíssimas (nanogramas, doses 1000 vezes menores que as necessárias para provocar efeitos sistêmicos) com efeito essencialmente local (apenas na veia do dorso da mão), sem efeitos sistêmicos.

Enquanto participando deste estudo, você não deve tomar parte em outro projeto de pesquisa sem a aprovação dos pesquisadores envolvidos nos estudos. Isso visa protegê-lo de possíveis problemas para sua saúde causados por exemplo, por retirada excessiva de amostras de sangue e interação de drogas usadas em pesquisas simultâneas.

Durante o período de cada estudo e avaliação funcional de 2 horas você ficará deitado no leito com um dos braços confortavelmente apoiado em um suporte de espuma. Em uma veia do dorso da mão será uma pequena agulha estéril tipo butterfly. Uma solução fisiológica (salina) estéril será infundida lentamente através desta agulha. Um aparelho de pressão será colocado no seu outro braço para medidas da pressão arterial, será feita também monitorização eletrocardiográfica mediante colocação de três eletrodos precordiais para registro do ritmo e da frequência cardíaca num monitor cardiológico instalado para tal finalidade para verificação de que não estão ocorrendo alterações no restante do corpo, já que as drogas nas dosagens a serem utilizadas, devem causar apenas efeito local na veia utilizada para o estudo. Um outro aparelho de pressão será colocado no membro superior avaliado e o manguito será insuflado e esvaziado várias vezes durante o teste.

Um pequeno tripé metálico será posicionado sobre o dorso de sua mão próximo ao local onde foi posicionada a ponta da agulha no interior da veia. Serão realizadas várias medidas do calibre da veia com este dispositivo, insuflando-se e esvaziando-se o manguito do braço utilizado para o teste. Três drogas serão infundidas: - fenilefrina, que reduz o calibre da veia a ser avaliada; - bradicinina que dilata a veia; nitroglicerina outro vasodilatador que é largamente usado em cardiologia.

Ocorrendo manifestações de hipersensibilidade a drogas ou intolerância aos estudos funcionais, o teste será interrompido imediatamente e o paciente dispensado do estudo.

Infecções no local da inserção da agulha são extremamente incomuns.

Após o término de cada teste, a agulha será retirada e você poderá alimentar-se (exceto café, chá ou coca-cola) e deambular normalmente.

O estudo será realizado em ambiente de ambulatório hospitalar (HC UNICAMP).

A amostra de sangue coletada durante o estudo será armazenada em tubos cônicos contendo EDTA e armazenados a -20°C até seu uso. Ocorrendo imprevistos que interferiram a utilização do material coletado ou este sendo insuficiente, nova convocação será feita para repetir a coleta de sangue venoso, obedecendo a seguinte regra. O volume total de sangue a ser coletado durante o período total de estudo (24 meses) não será superior a 200 ml.

Se você decidir participar no estudo, o Prof. Dr. Heitor Moreno Jr. ou Dr. Juan Carlos Yugar Toledo, ou outros médicos da equipe descreverão detalhadamente o estudo a você.

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

Este estudo poderá resultar em uma melhor compreensão dos fatores genéticos envolvidos na gênese da hipertensão arterial resistente e da disfunção endotelial vascular (arterial e venosa) presente.

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

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

Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Dr. Juan Carlos Yugar Toledo (fone: 017-227-3057) ou Prof. Dr Heitor Moreno Júnior (fone: 019 3206 0442).

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

A duração prevista do estudo será de 24 meses.

A SUA ASSINATURA, EM CADA PÁGINA DESTA 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 DESTA CONSENTIMENTO FOI DADA A VOCÊ.

Assinatura do voluntário

Data

Assinatura do investigador ou testemunha

Data

