

UNICAMP

THIAGO QUINAGLIA ARAÚJO COSTA SILVA

**“EFEITOS CARDÍACOS E HEMODINÂMICOS AGUDOS DO
SILDENAFIL NA HIPERTENSÃO RESISTENTE: MODULAÇÃO PELO
POLIMORFISMO ENOS T-786C”**

Campinas

2013



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

THIAGO QUINAGLIA ARAÚJO COSTA SILVA

**“Efeitos cardíacos e hemodinâmicos agudos do sildenafil na hipertensão resistente:
modulação pelo polimorfismo eNOS T-786C”**

Orientador: Prof. Dr. Heitor Moreno Junior

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de doutor em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO THIAGO QUINAGLIA ARAÚJO COSTA
SILVA E ORIENTADA PELO PROF. DR. HEITOR MORENO JUNIOR.

Assinatura do Orientador

Campinas

2013

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

Si38e Silva, Thiago Quinaglia Araújo Costa, 1979-
Efeitos cardíacos e hemodinâmicos agudos do sildenafil na hipertensão resistente : modulação pelo polimorfismo eNOS T-786 C / Thiago Quinaglia Araújo Costa Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Hipertensão. 2. Óxido nítrico sintase. 3. Sildenafil. 4. Diástole. 5. Polimorfismo. I. Moreno Junior, Heitor, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Acute cardiac and hemodynamic effects of sildenafil on resistant hypertension : modulation by T-786C eNOS polymorphism

Palavras-chave em inglês:

Hypertension
Nitric oxide synthase
Sildenafil
Diastole
Polymorphism

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Heitor Moreno Junior [Orientador]
Andrei Carvalho Sposito
Fabiola Taufic Monica Iglesias
Valeria Cristina Sandrim
Juan Carlos Yugar Toledo

Data de defesa: 23-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

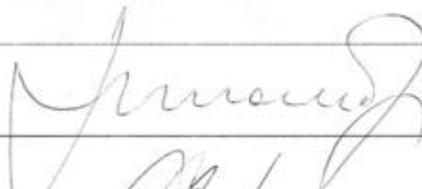
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

THIAGO QUINAGLIA ARAÚJO COSTA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. HEITOR MORENO JUNIOR

MEMBROS:

1. PROF. DR. HEITOR MORENO JUNIOR



2. PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO



3. PROF. DR. FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS



4. PROF. DR. VALERIA CRISTINA SANDRIM



5. PROF. DR. JUAN CARLOS YUGAR TOLEDO



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

Data: 23 de agosto de 2013

*Minha Marília,
Se tens beleza,
Da natureza
É um favor.
Mas se aos vindouros
Teu nome passa,
É só por graça
Do Deus do amor,
Que, terno, inflama
A mente, o peito
Do teu pastor*

Tomás Antônio Gonzaga

à Marília, minha noiva e companheira, pela dedicação, amor e compreensão,
ofereço.

Agradecimentos

À minha família, meu pai, José Carlos, pela inspiração; minha mãe, Odimary, pela ternura; minhas irmãs, Carol e Érica, pela cumplicidade. Aos meus primos e primas, tios e tias, ao meu afilhado Carlos Henrique, aos meus avós, Neide, Zuza e Dindinha, e tios-avós, Olga e Zezinho, e a todos àqueles dos quais o espaço me separa, mas um abraço traz ao pensamento.

Aos meus amigos, os quais, também, a distância levou, mas o tempo nunca levará. Em especial, ao Carlos Eduardo Nerosky, Rodrigo Sampaio, Leonardo da Costa Val, Lucas Salviano, Rafael Almeida de Oliveira, Mauro Takao Suzuki, Maria Carolina Andolpho, Camila Costa Pinto e Henrique Espindola. Às amigas Ana Paula Beckhauser e Josiane Marchioro, pelos grandes momentos vividos.

Àqueles que contribuíram e participaram direta e indiretamente na realização desta tese, e que são também grandes amigos, Valéria Nasser, Bárbara Rampazzo, Ana Paula Faria, Caroline Demacq, Vanessa Fontana, Natália Ruggeri Barbaro, Andréa Sabatini, Adilson Tomás, Joaquim Francisco do Prado, Marcelo da Costa Gomes, Rafael Prado Martins, Rodrigo Cardoso Santos e Rodrigo Modolo.

Ao professor Heitor Moreno Jr., pela dedicação e criatividade doados ao trabalho e pelas oportunidades a mim oferecidas.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões e considerações.

Ao paciente, que repleto de simplicidade deposita esperanças—as quais devem sempre ser correspondidas—nas mãos do trabalhador da saúde.

À Deus, que é a força maior que a tudo assiste e a todos ampara.

“Nous ne créons jamais pour autrui que des points de départ”

(Nós, para os outros, apenas criamos pontos de partida).

Simone de Beauvoir

Resumo

Objetivo: A falha no controle da pressão arterial (PA), apesar do uso de três ou mais anti-hipertensivos caracteriza hipertensão arterial resistente (HAR). A disfunção endotelial está intrinsecamente associada a esta condição e inibidores da fosfodiesterase 5 (iPDE5)—inibindo a degradação de GMP cíclico (GMPc)—reduzem a PA em pacientes com HAR. A administração aguda de iPDE5 poderia melhorar parâmetros hemodinâmicos, endoteliais e de função diastólica do ventrículo esquerdo (FDVE) em pacientes com HAR e o polimorfismo T-786C da sintase de óxido nítrico (NO) endotelial (eNOS) modularia essas respostas. **Métodos:** Os pacientes (n = 26) foram dispostos em três grupos de acordo com o genótipo da eNOS T-786C: CC (n = 8), a CT (n = 9) e TT (n = 9). Doses crescentes de sildenafil oral (37,5, 50 e 100 mg) e placebo (em datas separadas por pelo menos 2 semanas) foram administradas a intervalos de 30 minutos, enquanto parâmetros hemodinâmicos (não invasivos e contínuos) foram obtidos. Também foram determinados: FDVE; vasodilatação mediada por fluxo (VMF); e nitrito e GMPc plasmáticos ao início e término do protocolo. **Resultados:** PA média (PAM) e resistência periférica total (RPT) diminuíram no grupo total (n=26) após o sildenafil ($84,17 \pm 21,04$ - $75 \pm 17,21$ mmHg, $1149 \pm 459,7$ - $1,037$ dyn.s/cm⁻⁵ ± 340 , respectivamente; p<0,05). Similarmente, o sildenafil melhorou a FDVE (volume atrial esquerdo: $25 \pm 5,8$ - $20 \pm 4,4$; Tempo de relaxamento isovolumétrico: $104 \pm 19,33$ - $88 \pm 15,22$; E/e'septal: $9,7 \pm 3,8$ - $7,9 \pm 2,9$; E/e' lateral: $7,7 \pm 3,4$ - $6,4 \pm 3,2$; p<0,05). Os grupos TT e TC obtiveram redução sustentada da RPT ao longo do protocolo. No CC, os valores da RPT retornaram aos basais após as doses. Não houve alterações significativas da VMF, nitrito e GMPc após a administração do sildenafil. **Conclusão:** A administração aguda de iPDE5 melhora o perfil hemodinâmico e função diastólica em HAR e o polimorfismo T-786C da eNOS modula a resposta hemodinâmica, mas não a FDVE. **Palavras-chave:** hipertensão resistente, sildenafil, função diastólica, perfil hemodinâmico, disfunção endotelial, polimorfismo eNOS.

Abstract

Purpose: Failure to control blood pressure (BP) despite the use of three or more drugs characterizes resistant hypertension (RHTN). Impaired endothelial function is associated to this condition and phosphodiesterase-5 inhibitors (PDE5i)—inhibiting cGMP breakdown—reduce BP in RHTN patients. We hypothesized that acute administration of PDE5i could ameliorate hemodynamic, endothelial parameters and left ventricular diastolic function (LVDF) in RHTN patients and that the T-786C nitric oxide (NO) endothelial synthase (eNOS) polymorphism could modulate these responses. **Methods:** Subjects (n= 26) were arranged into three groups: CC (n= 8), TC (n= 9) and TT (n= 9) according to T-786C eNOS genotype. Increasing doses of oral sildenafil (37.5, 50 and 100 mg) and placebo (in protocols at least 2 weeks apart) were given at 30 minute intervals while continuous non-invasive hemodynamic measures were assessed. LVDF, Flow Mediated Dilation (FMD), plasma nitrite and cGMP were also determined. **Results:** Mean arterial pressure (MAP) and total peripheral resistance (RPT) decreased in all patients (84.17 ± 21.04 to 75 ± 17.21 mmHg; 1149 ± 459.7 to 1037 ± 340 dyn.s/cm⁻⁵, respectively; $p < 0.05$). Likewise, sildenafil improved LVDF parameters (Left atrial volume: 25 ± 5.8 to 20 ± 4.4 ; Isovolumetric relaxation time: 104 ± 19.33 to 88 ± 15.22 ; E/e' septal: 9.7 ± 3.8 to 7.9 ± 2.9 ; E/e' lateral: 7.7 ± 3.4 to 6.4 ± 3.2 ; $p < 0.05$). While TT and TC genotype groups sustained RPT reduction during the increasing sildenafil doses, CC group failed to sustain the RPT drop, by the end of the protocol. No statistical changes were found in FMD, nitrite and cGMP after PDE5i administration. **Conclusion:** Our data suggest PDE5i acutely improves hemodynamic profile and diastolic function in RHTN, also T-786C eNOS polymorphism modulates the hemodynamic response, but not diastolic function.

Keywords: Resistant hypertension, sildenafil, diastolic function, hemodynamic pattern, endothelial dysfunction, eNOS polymorphism.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AHA	American Heart Association
ALLHAT	Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial
AMPA	Automedida da Pressao Arterial
AMPc	Monofosfato Ciclico de Adenosina
AOS	Apneia Obstrutiva do Sono
BNP	Peptideo Natriuretico Cerebral
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
eNOS	Sintase endothelial de óxido nítrico
FC	Frequência Cardíaca
DC	Débito Cardíaco
DDVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DSVE	Diâmetro sistólica do ventrículo esquerdo
ERP	Espessura relativa de parede
FDVE	Função diastólica do ventrículo esquerdo
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Monofosfato Ciclico de Guanosina
HAR	Hipertensao Arterial Resistente
HAS	Hipertensao Arterial Sistemica
HVE	Hipertrofia Ventricular Esquerda
IC	Insuficiencia Cardiaca
iPDE5	Inibidores da fosfodiesterase 5
IMC	Indice de Massa Corporal
MAPA	Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial
NO	Oxido Nitrico
PA	Pressão Arterial
PAM	Pressão Arterial Média
PAD	Pressão Arterial Diastolica
PAS	Pressão Arterial Sistolica
PB	Fosfolamban
PDE	Fosfodiesterase
PDE5	Fosfodiesterase 5
PK	Fosfoquinase
PPVE	Parede posterior do ventrículo esquerdo
RPT	Resistência Periférica Vascular Total
SIV	Septo interventricular
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TDE	Tempo de Desaceleracao da onda E
TRIV	Tempo de Relaxamento Isovolumétrico

Lista de Tabelas

Tabela 1. Definições de hipertensão resistente.....	30
Tabela 2. Dose-proporcionalidade do sildenafil.....	68
Tabela 3. Efeitos hemodinâmicos do sildenafil.....	69
Tabela 4. Características gerais dos pacientes estudados.....	93
Tabela 5. Parâmetros bioquímicos dos pacientes.....	94
Tabela 6. Distribuição dos anti-hipertensivos entre os grupos estudados.....	95
Tabela 7. Parâmetros hemodinâmicos no tempo basal e após cada dose de sildenafil conforme os grupos genotípicos.....	102
Tabela 8. Parâmetros diastólicos no tempo basal e após sildenafil conforme os grupos genotípicos.....	106

Lista de Ilustrações

Figura 1. Fisiopatologia da disfunção diastólica.....	38
Figura 2. Classificação de disfunção diastólica.....	43
Figura 3. Via NO-GMPc e ação vascular da PDE5.....	48
Figura 4. Concentração plasmáticas de sildenafil após doses crescentes orais.....	50
Figura 5. Localização dos principais polimorfismos da eNOS.....	60
Figura 6. Protocolo do estudo.....	70
Figura 7. Níveis plasmáticos de nitrito e GMPc no grupo total de pacientes.....	75
Figura 8. Níveis plasmáticos de nitrito conforme os grupos genotípicos.....	76
Figura 9. VMF antes (pré) e depois (pós) sildenafil no grupo total de pacientes.....	77
Figura 10. VMF antes (pré) e depois (pós) sildenafil conforme os grupos genotípicos.....	77
Figura 11. Parâmetros hemodinâmicos no tempo basal e após as doses crescentes de sildenafil no grupo total de pacientes.....	78
Figura 12. Deltas da PAM e RPT após cada dose de sildenafil no grupo total de pacientes....	79
Figura 13. Parâmetros hemodinâmicos no tempo basal e após as doses crescentes de sildenafil conforme os grupos genotípicos.....	82
Figura 14. Parâmetros hemodinâmicos no tempo basal e após doses de placebo conforme os grupos genotípicos.....	82
Figura 15. Parâmetros de função diastólica antes (pré) e depois (pós) a administração de sildenafil e placebo.....	84
Figura 16. Parâmetros de função diastólica antes (pré) e depois (pós) a administração de sildenafil conforme os grupos genotípicos.....	86

Sumário

1. Introdução	28
1.1 Considerações Gerais	28
1.2 Hipertensão Arterial Resistente (HAR)	29
1.2.1 Definição	29
1.2.2 Diagnóstico.....	31
1.2.3 Prevalência	32
1.2.4 Fisiopatologia da HAR	33
1.2.4.1 Padrão Hemodinâmico da HAR.....	34
1.2.4.2 Influência do Óxido Nítrico na Resistência Periférica Vascular Total	35
1.2.4.3 HAR e Disfunção Endotelial.....	36
1.3 Aspectos Genéticos da Hipertensão Arterial	37
1.4 Tratamento Farmacológico e Não Farmacológico da HAR	40
1.5 Disfunção Diastólica do Ventrículo Esquerdo (DDVE)	42
1.5.1 DDVE e HAR: Prevalência	42
1.5.2 DDVE: Fisiopatologia	42
1.5.3 Modulação Aguda da Função Diastólica	43
1.5.3.1 Homeostase do Cálcio na Diástole.....	45
1.5.3.2 Influência das Proteínas do Sarcômero na Diástole	45
1.5.3.3 Óxido Nítrico e Função Diastólica	46
1.5.4 Avaliação da Função Diastólica do Ventrículo Esquerdo.....	48
1.6 Endotélio	51
1.6.1 Oxido Nítrico (NO).....	52
1.6.2 Disfunção Endotelial	54
1.6.3 Avaliação da Função Endotelial	55
1.6.3.1 Vasodilatação Mediada por Fluxo (VMF).....	55
1.6.3.2 Marcadores Plasmáticos de NO	56
1.6.4 Características das Sintases de Óxido Nítrico	57
1.6.5 NO Sintase Endotelial (eNOS)	57
1.6.5.1 Estrutura e localização da eNOS	57
1.6.5.2 Regulação da Atividade e Expressão da eNOS.....	58
1.6.5.3 Polimorfismos Clinicamente Relevantes da eNOS.....	59
1.6.5.3.1 Polimorfismo T-786C e Implicações Clínicas.....	61

1.7 Fosfodiesterases	63
1.7.1 GMPc.....	63
1.7.2 Fosfodiesterase 5	65
1.7.2.1 inibidores de Fosfodiesterase 5	66
1.7.2.2 Efeitos Cardiovasculares dos inibidores da PDE5	70
3 Objetivos	78
4 Hipótese	80
5 Métodos	82
5.1 Casuística	82
5.2 Genotipagem	83
5.3 Nitrito e GMP cíclico	84
5.4 Vasodilatação Mediada pelo Fluxo (VMF)	84
5.5 Avaliação Hemodinâmica Contínua	85
5.6 Ecocardiografia	86
5.7 Protocolo do Estudo	88
5.8 Análise Estatística	90
6 Resultados	92
6.1 Casuística	92
6.2 Nitrito e GMPc Plasmáticos	96
6.2.1 Hipertensos Resistentes.....	96
6.2.2 Genótipos da eNOS (TT Versus TC Versus CC)	97
6.3 Vasodilatação Mediada Pelo Fluxo (VMF)	98
6.3.1 Hipertensos Resistentes.....	98
6.3.2 Genótipos da eNOS (TT Versus TC Versus CC)	98
6.4 Efeitos Hemodinâmicos	99
6.4.1 Hipertensos Resistentes.....	99
6.4.2 Genótipos da eNOS (TT Versus TC Versus CC)	101
6.5 Parâmetros de Função Diastólica	105
6.5.1 Hipertensos Resistentes.....	105
6.5.2 Genótipos da eNOS (TT Versus TC Versus CC)	106
6.6 Efeitos Adversos	107
7 Discussão	110
8 Conclusões	118

9 Referências	120
----------------------------	------------

Introdução

1. Introdução

1.1 Considerações Gerais

Em 2025, é previsto que mais de 1,5 bilhão de pessoas no mundo desenvolverão hipertensão. Esta condição será responsável por até 50% do risco de doença cardíaca e 75% do risco de acidentes vasculares cerebrais [1]. Há várias décadas, é bem conhecido que a redução da pressão arterial (PA) com modificação do estilo de vida, medicamentos, ou ambos, podem reduzir substancialmente o subsequente risco do paciente hipertenso [2]. Para cada redução de 10 mm Hg na PA sistólica (PAS), o risco médio de mortalidade por doença cardíaca e por acidente vascular cerebral diminui em 30% e 40%, respectivamente [3]. Apesar dos claros benefícios, apenas metade das pessoas com hipertensão têm controle da PA adequada, de acordo com dados norte-americanos [4]. Existem muitas causas para o controle ineficaz da PA além de estilo de vida inapropriado, não adesão à medicação [5, 6] e falha em intensificar a terapêutica pelo médico assistente (inércia clínica) [7, 8]. Estudos aleatorizados comparativos demonstram que, para reduções semelhantes da PA, há redução semelhante na incidência de morbidade e mortalidade cardiovascular mesmo com classes diferentes de anti-hipertensivos [9]. Isso reforça o entendimento que o benefício da droga depende largamente da redução dos valores pressóricos.

Em hipertensão arterial resistente (HAR), o impacto do controle da PA, sobre a morbimortalidade, deve ser ainda maior dado que estes pacientes têm maiores valores pressóricos e maior risco cardiovascular global. Não há estudos sobre a relação custo-benefício do tratamento não-farmacológico ou farmacológico em HAR. Alguns estudos, demonstram apenas que algumas medidas são potencialmente benéficas na redução da PA neste subgrupo de pacientes. A redução na ingestão de sódio demonstrou significativa redução da PA (22.7/9.1 mmHg, PAS e PAD, respectivamente) neste grupo [10]. Avaliações do uso do CPAP (*Continuous positive airway*

pressure)—quando apnéia obstrutiva do sono é uma possível causa atribuível de resistência ao tratamento—indicaram apenas um efeito modesto na PA e, portanto, no benefício ao hipertenso resistente [11]. Em relação ao tratamento farmacológico uma combinação inicial tripla (um inibidor da enzima conversora da angiotensina ou antagonista do receptor de angiotensina II; um bloqueador de canal de cálcio; e um diurético tiazídico) parece reduzir mais a PA e lesões de órgão-alvo [12, 13]. E como quarta droga, a espironolactona parece ser a melhor escolha, devido à queda de pressão adicional e ao papel da aldosterona na fisiopatologia da HAR [14-16]. No entanto, ainda há um longo caminho a ser percorrido até que portadores de HAR tenham sua doença adequadamente controlada.

1.2 Hipertensão Arterial Resistente (HAR)

1.2.1 Definição

Hipertensão arterial resistente é atualmente reconhecida como a condição na qual a PA permanece acima da meta apesar do uso de três ou mais drogas anti-hipertensivas ou na qual a PA foi controlada requerendo, para tanto, quatro ou mais drogas de diferentes classes e em doses adequadas [13]. A definição foi inicialmente formalizada, apesar de já ser corrente, pelo *US Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure* (JNC 7) (2004), o qual determinava que o tratamento incluísse um diurético. Em 2008, uma nova proposta foi publicada nos periódicos *Circulation* e *Hypertension* detalhando a definição ao diferenciar estes pacientes em resistentes controlados e não controlados e preconizando que o diurético fosse apenas idealmente incluído [13]. Mais recentemente, pesquisadores de biologia vascular e hipertensão (*Vascular Biology and Hypertension Program of the University of Alabama*) sugeriram o termo hipertensão refratária, também já cunhado previamente, para

classificar estes últimos pacientes nos quais não se controla a PA apesar de todos os esforços [17].

Embora seja uma divisão arbitrária—em que pese o número de medicamentos para a caracterização da condição—a intenção é de separar o grupo de hipertensos que possui maior risco cardiovascular e, portanto, merece tratamento intensivo. Além disso, ao fazê-lo aumenta-se a probabilidade do diagnóstico de causas secundárias e, portanto, a identificação de condições tratáveis de hipertensão [13]. De fato, tem sido demonstrado que HAR tem maior associação com lesões de órgão-alvo (incluindo espessamento de camada íntima-média de carótida, hipertrofia ventricular esquerda, microalbuminúria e lesões retinianas) comparados àqueles que tiveram a pressão controlada [18, 19]. E a prevalência de causas secundárias, dentro do subgrupo de pacientes resistentes (ou de “difícil controle” antes do diagnóstico das causas secundárias), é de cerca de 34% [20]— embora ainda não haja estudos com o fim específico de encontrar este dado.

Tabela 1. Definições de Hipertensão Resistente	
Hipertensão Resistente A falha para atingir a PA alvo (<140/90 mmHg) utilizando um mínimo de três fármacos anti-hipertensivos em doses máximas toleradas, uma das quais deve ser um diurético.	
Hipertensão resistente controlada Os pacientes que se enquadram na definição de hipertensão resistente, mas cuja a PA é controlada em doses máximas toleradas de quatro ou mais medicamentos anti-hipertensivos.	Hipertensão Refratária Os pacientes que se enquadram na definição de hipertensão resistente, mas cujo a pressão não é controlada com doses máximas toleradas de quatro ou mais medicamentos anti-hipertensivos.

Por outro lado, o prognóstico de longo prazo ainda não está adequadamente estabelecido. Alguns estudos revelam algumas informações sobre desfechos cardiovasculares graves (“*hard endpoints*”). Por exemplo, em uma coorte de pacientes hipertensos, foi demonstrado que os pacientes verdadeiramente resistentes apresentaram risco de eventos cardiovasculares fatais ou não fatais quase três vezes maior (RR= 2.94, $p < 0.05$) que os hipertensos controlados. Neste mesmo estudo, aqueles portadores de pseudo-resistência tiveram prognóstico semelhante aos controlados com medicação [21]. Similarmente, pacientes resistentes (ajustados para idade e sexo) acompanhados por sete anos tiveram maior incidência acidente vascular cerebral (AVC) e insuficiência renal crônica (IRC) [22]. Apesar destes resultados contundentes, é possível que o pior prognóstico, a longo prazo, esteja diretamente ligado às seguintes variáveis: maiores valores pressóricos; exposição prolongada à hipertensão não controlada; ou presença dos fatores comuns à condição de resistência ao tratamento, que agregariam risco (idade mais avançada, obesidade, diabetes e/ou insuficiência renal crônica). De qualquer maneira, estes fatores são reconhecidos como deflagradores e/ou condutores da HAR [23, 24] e, portanto, não deveriam ser analisados separadamente.

1.2.2 Diagnóstico

Para o diagnóstico preciso de HAR verdadeira é necessário excluir causas secundárias de hipertensão (notoriamente, hiperaldosteronismo primário, nefropatia crônica avançada e estenose de artéria renal; além de causas endócrinas e coarctação de aorta, que são mais raras), causas removíveis e pseudoresistência. Pseudoresistência refere-se à falta de aderência ao tratamento (farmacológico ou não farmacológico), efeito do jaleco branco, técnica inadequada de aferição da PA (manguitos pequenos para a circunferência do braço) e rigidez acentuada da artéria braquial (pseudo-hipertensão: comum em idosos). As causas removíveis incluem, de forma geral, ingestão

elevada de sal e álcool ou de outras substâncias exógenas que dificultam o controle pressórico (apneia obstrutiva do sono, anti-inflamatórios não hormonais, corticosteroides, contraceptivos orais, simpatomiméticos, quimioterápicos, antidepressivos, imunodepressores, descongestionantes nasais, anorexígenos e cocaína). É importante ressaltar, que, segundo as diretrizes em HAR preconizadas pela *American Heart Association* [13], a monitorização ambulatorial da PA (MAPA) é o único método válido para diferenciar a HAR da hipertensão “resistente” apenas no consultório (“efeito jaleco branco”) em pacientes já com mais de três classes de anti-hipertensivos. Além disso, a MAPA tem valor prognóstico adicional para além do que o fornecido pela medida de consultório [25].

O fenótipo do hipertenso resistente tem características comuns consistentemente demonstradas (em estudos nacionais e internacionais): idade mais avançada (>55 anos), sexo feminino, afrodescendência, obesidade, diabetes melito, nefropatia crônica, síndrome metabólica, aumento de ingestão de sal, maiores valores pressóricos iniciais e sedentarismo [13, 26-28]. No entanto, o subgrupo de resistentes não controlados (refratários) parece apresentar maior rigidez vascular, hipertrofia ventricular esquerda, pior função endotelial, níveis mais elevados de leptina e aldosterona, além de menor queda da PA no período noturno [28, 29] e por isso, um provável pior prognóstico. Isso sugere que talvez haja uma gradação do risco, mesmo dentro do grupo de hipertensos resistentes.

1.2.3 Prevalência

A prevalência da HAR varia conforme a especialização do centro e o tipo de análise epidemiológica, em geral oscila entre de 3 e 12%. Relatos que descrevem uma prevalência maior que 10%, normalmente, não excluem pacientes com MAPA normal ou não submetem os pacientes a uma avaliação sistematizada para o diagnóstico de HAR e exclusão de causas

secundárias ou removíveis e de pseudoresistência [30, 31]. Em uma clínica terciária da Universidade do Alabama (Birmingham)—para a qual são encaminhados pacientes com hipertensão de difícil controle e acompanhados por pelo menos 6 meses antes de considerados verdadeiros hipertensos resistentes—9,5% (de 304 pacientes) permaneceram refratários ao tratamento (não controlados) [17]. Também nos Estados Unidos, uma análise dos dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES 2003-2008) estima que cerca de 8,9% dos adultos hipertensos apresentam critérios de resistência ao tratamento, apesar de apenas 86% fazerem uso de diurético. É interessante notar que quando não são utilizados diuréticos, por motivos vários, também há casos nos quais não se obtém controle da PA apesar de quatro ou mais drogas—cerca de 6% dos hipertensos em estudos retrospectivos (29.474 pacientes) [27]—sugerindo que a definição mais restrita (que exige que um diurético esteja prescrito) pode não incluir alguns pacientes.

1.2.4 Fisiopatologia da HAR

A fisiopatologia da HAR é reconhecidamente multifatorial, porém os mecanismos de resistência ao tratamento não são totalmente conhecidos. O fato da definição de HAR ser baseada no tratamento dificulta ainda mais o estabelecimento de marcos fisiopatológicos para a doença. Algumas características são comuns à maioria dos pacientes: hiperativação do sistema nervoso simpático e sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) [32-34]; excesso de aldosterona [35, 36]; expansão volêmica [37], disfunção endotelial [38, 39] [40]; e elevação da resistência vascular periférica [20]. Recentemente, hipoxemia intermitente cíclica [41], resistência à insulina [42] e alterações na função de adipocinas [43] também têm sido associados à patogenia da doença.

A sobrecarga de volume parece justificar, em grande parte a fisiopatologia da doença [37] (acompanhada por um balanço positivo de sódio corporal). Um dos principais fatores determinantes da PA—e da composição aquosa do corpo—é o equilíbrio entre ingestão hídrica oral, e perdas renal e extra-renal. Este balanço é regulado pelo SRAA, peptídeo natriurético atrial e os receptores atriais e renais de pressão [44]. A patogenia desta característica é diversa: nefrosclerose hipertensiva e/ou disfunção renal estabelecida; uso de vasodilatadores diretos e simpatolíticos periféricos (que promovem reabsorção renal hídrica em resposta a uma vasodilatação sistêmica); diminuição da perfusão renal (e filtração glomerular) resultante do uso intensivo de anti-hipertensivos; sobrecarga de sódio na dieta; obesidade e síndrome metabólica; níveis elevados de aldosterona plasmática; e uso inadequado de diuréticos [10, 13, 20].

O fato da sobrecarga de volume ser um componente frequente incita o uso de diuréticos. Estudos de intervenção apresentam resultados favoráveis ao uso intensivo de diuréticos, apesar de alguma controvérsia. Alguns demonstram que a resposta pode não ser satisfatória [17] enquanto a maioria traz resultados promissores: por meio do bloqueio nefrológico sequencial [45] ou simplesmente pela intensificação do uso—embora, sob o risco de piora da função renal [20].

1.2.4.1 Padrão Hemodinâmico da HAR

Alguns autores sugerem, no entanto, que o aumento da resistência vascular periférica total e/ou do débito cardíaco seriam mais importantes que a sobrecarga de volume. Essa conclusão é sugerida pelo fato de não haver supressão dos níveis de aldosterona ou de atividade de renina plasmática—resultados esperados na sobrecarga de volume—em hipertensos refratários quando comparados a resistentes controlados. Além disso, estes pacientes refratários apresentariam frequência cardíaca persistentemente mais elevada que o último grupo; sugerindo uma maior influência do sistema nervoso simpático para a resistência ao tratamento [17].

Ademais o aumento da resistência vascular periférica total tende a ser acentuado e persistente na evolução da doença hipertensiva [46]. Geralmente atribuído a um aumento no tônus vascular [47], o mecanismo é comum aos hipertensos em geral, nos quais após um aumento inicial do débito cardíaco, eleva-se a resistência vascular periférica total progressivamente, independentemente da classificação da hipertensão. Ocorre precocemente aos esforços e, com a progressão da doença, passa a ocorrer ao repouso. Este efeito foi demonstrado em longas coortes de até vinte anos de seguimento [48]. A grande influência do estímulo simpático tem servido de base racional para os recentes e crescentes estudos intervencionistas de denervação renal para o tratamento da HAR, com resultados promissores [49, 50].

1.2.4.2 Influência do Óxido Nítrico na Resistência Periférica Vascular Total

No contexto da resistência periférica, o endotélio, como regulador do fluxo sanguíneo tecidual, tem papel crucial. Os mais importantes mediadores de vasodilatação produzidos pelo endotélio são o óxido nítrico (NO), prostaciclina e o fator hiperpolarizante produzido pelo endotélio. O NO, produzido pela isoforma da sintase endotelial do NO (eNOS), ativa a guanilato ciclase e aumenta os níveis intracelulares de guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico (GMPc), levando à vasodilatação e à redução da resistência periférica total (RPT). Os principais fatores vasoconstritores endoteliais são a angiotensina II, a endotelina, o tromboxano e os radicais superóxido. Em condições normais, existe uma tendência à vasodilatação, predominando a ação das prostaciclina e do NO [51]. A redução da atividade de NO resulta em disfunção endotelial, que é um preditor de eventos cardiovasculares na hipertensão [46] e um reconhecido elemento da HAR [40, 47].

Estas anormalidades arteriais incipientes, aparentemente funcionais, já foram demonstradas até em jovens livres de doença cardiovascular manifesta, mas com fatores de risco

cardiovascular. Devem-se, em geral, a uma biodisponibilidade diminuída do NO determinando um tono arterial reduzido [52] e, subseqüentemente, à diminuição da liberação estimulada de vasodilatadores endoteliais [53]. Diversos modelos experimentais de hipertensão (em ratos) demonstraram comprometimento do relaxamento arterial dependente do endotélio [54, 55]. Entretanto, o grau de disfunção endotelial pode ser variável dependendo do modelo estudado e do tempo de hipertensão estabelecida. Estas alterações são conjuntamente denominadas de disfunção endotelial, uma condição presente precocemente no processo fisiopatológico da hipertensão, mas que persiste e favorece a perpetuação da HA e HAR [39, 56, 57].

Com a perpetuação da doença, em hipertensos resistentes, instalam-se alterações estruturais que caracterizam o remodelamento arterial, porém não se sabe até que ponto coexistem com os mecanismos iniciais de disfunção endotelial [38]. Em pequenas artérias de resistência, o remodelamento arterial, que inclui rigidez arterial e rarefação de arteríolas, corresponde a lesão de órgão-alvo precoce antecedendo as manifestações clínicas [58]. A posteriori, instala-se o espessamento das paredes de artérias de condução e conseqüente aumento da pressão de pulso e desenvolvimento de placas ateroscleróticas [59].

1.2.4.3 HAR e Disfunção Endotelial

Um estudo interessante demonstrou que pacientes hipertensos resistentes (não controlados ou refratários) têm disfunção da vasodilatação endotélio-dependente, avaliada por VMF braquial, semelhante a de portadores de diabetes não compensados (glicemia de jejum >126 mg/dl e hemoglobina A_{1C}> 7.0%) e tabagistas graves (>20 cigarros/dia por >10 anos) [40]. A vasodilatação independente do endotélio é comparável a de diabéticos não compensados e pior que a de tabagistas graves, segundo o estudo. Apesar disso, os níveis plasmáticos de nitrito/nitrato foi semelhante para o grupo HAR e grupo controle (voluntários hígidos), assim

como os níveis de GMPc e tromboxano (TX-B₂). Esses resultados indicam a gravidade da disfunção endotelial em paciente hipertensos resistentes, que é similar a de condições clínicas reconhecidamente associadas a desfechos nefastos.

1.3 Aspectos Genéticos da Hipertensão Arterial

As evidências demonstrando que a PA é geneticamente determinada, vêm de estudos de correlação de valores pressóricos entre parentes, como por exemplo, o coeficiente de correlação para PA entre gêmeos monozigóticos, que é aproximadamente 0,75, enquanto, este coeficiente de correlação para irmãos não gêmeos é aproximadamente 0,25 [60]. Estes valores indicariam uma importante influência dos genes nos níveis pressóricos sanguíneos, no entanto, 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 [61, 62].

Assim, a herança na hipertensão arterial é complexa, assumida como poligênica e heterogênea, com contribuição importante do ambiente (multifatorial). As doenças poligênicas continuam a representar desafio considerável para a investigação genética e tentativa de esclarecê-las estão apenas em seu início [63, 64].

A identificação de variações de genes (alelos) que contribuem para o desenvolvimento de hipertensão arterial é complicada pelo fato de dois fenótipos que determinam a PA—débito cardíaco e resistência periférica—estarem controlados por fenótipos intermediários, incluindo atividade do sistema nervoso simpático, SRAA, sistemas renais caliceína-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 [65]. Além disso, esses fenótipos intermediários são também controlados por mecanismos complexos incluindo o próprio nível de PA. Desta forma, muitos genes podem participar no desenvolvimento da hipertensão arterial. Além disso, a variação na resposta a diferentes drogas anti-hipertensivas constitui tema muito discutido em farmacogenética. Tem sido demonstrado que variantes genéticas comuns na população geral (polimorfismos) modulariam a resposta a fármacos em diversas condições patológicas, incluindo hipertensão arterial—principalmente os que atuam sobre o SRAA [66, 67].

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 presente 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. 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 1000 pares de bases. O genoma completo possui 3 a 10 milhões de polimorfismos de base única, destes, aproximadamente 1-1,5 milhões foram caracterizados pelo consórcio internacional de detecção de polimorfismos de base única [68].

Muitas destas alterações estão presentes em sequências de DNA que não são codificadores, as quais correspondem a 90% do total do DNA. Assim, apenas uma minoria dos polimorfismos pontuais pode ser detectada em regiões codificadoras dos genes. Os polimorfismos de nucleotídeo único presentes nas sequências 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 qualitativa na estrutura da proteína (e na sua função) ou alteração da expressão da proteína [69, 70]. Por outro lado, alguns polimorfismos posicionados tanto em sequências reguladoras como nos íntrons, podem afetar a transcrição aumentando-a ou diminuindo-a. Devido à redundância do código genético, determinados polimorfismos não resultam em qualquer efeito [71].

Como um fenótipo extremo da hipertensão essencial, é razoável crer que fatores genéticos desempenhem um papel maior na HAR do que na população hipertensa geral. A importância das propriedades vasodilatadoras do NO em artérias de resistência e a importante contribuição genética para a hipertensão, previamente demonstrada [72], podem sugerir que alterações genéticas afetando a expressão eNOS, e portanto, a produção de NO, podem contribuir para a elevação da PA sistêmica e resistência farmacológica ao tratamento. Evidências de estudos clínicos e em animais indicam que alterações na via NO-GMPc têm relevância na origem da hipertensão [73, 74] e corroboram com essa hipótese. Além disso, a resposta a fármacos anti-hipertensivos também poderia ser modulada devido a polimorfismos que influenciem esta via. Recentemente, foi publicado estudo no qual um *SNP* ocorrendo na região promotora do gene da eNOS (T-786C) modularia a resposta ao enalapril dependendo do genótipo do paciente.

1.4 Tratamento Farmacológico e Não Farmacológico da HAR

O tratamento da HAR inclui mudanças do estilo de vida, interrupção do uso de substâncias que possam elevar os valores pressóricos (e.g., anti-inflamatórios não hormonais), uso de um regime terapêutico multi-droga eficaz (escolha adequada de drogas anti-hipertensivas e sua prescrição em doses otimizadas) e quando necessário tratamento intervencionista (denervação simpática renal e ativação de barorreflexo carotídeo, ambos porém ainda em processo de validação).

Apesar de não ter sido testado especificamente na HAR, no que se refere a mudanças do estilo de vida, recomenda-se: redução do peso (em caso de sobrepeso ou obesidade); atividade física moderada (> 150 min/semana); ingesta reduzida de sódio [10] (<2 g/dia); e moderação no consumo de bebidas alcóolicas (<2 doses/dia para homens; <1 dose/dia para mulheres); dieta rica em fibras, com baixa densidade calórica e reduzido teor de gorduras saturadas e totais [75]. Excetuando-se a redução da ingesta de sódio (já testada especificamente em pacientes hipertensos resistentes), estas recomendações são baseadas nas VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Referem-se, portanto, ao paciente hipertenso geral, mas presumivelmente, também trazem benefício para o tratamento da HAR.

A utilização de diuréticos é mandatória devido ao caráter de expansão volêmica destes pacientes. E esta ação inclui, além disso, aumentar a dose ou mudar a classe do diurético (além do uso concomitante de diuréticos, recentemente descrito [45]). É preferível a utilização de diurético tiazídico de longa duração. Portanto, clortalidona sobrepõe-se à hidroclorotiazida neste contexto (principalmente, por seu efeito noturno sobre a PA [76]). Além disso, deve-se reservar o uso de diuréticos de alça para pacientes com alteração da função renal (Clearance de Creatinina < 30 mg por ml por min por 1.73m²).

Como já mencionado, a combinação que parece ter maior eficácia, associada ao diurético, compreende o uso de um bloqueador de canal de cálcio e um antagonista do SRAA. Um efeito adicional pode ser obtido com o acréscimo de um antagonista de receptor mineralocorticóide (e.g., espironolactona 12.5-50 mg), como quarta droga. Numa análise *post hoc* do estudo *Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial* a adição de espironolactona a um esquema triplo reduziu a PA em 21.9/9.5 mmHg. Outros medicamentos que poderiam ser introduzidos como quarta droga são doadores de NO de longa duração (principalmente para hipertensão arterial sistólica isolada do idoso), agonistas adrenérgicos centrais e beta-bloqueadores com ação vasodilatadora periférica. Além dos citados, outros fármacos com potencial efeito benéfico sobre a PA (carater experimental), em hipertensos resistentes (associados ou não a um doador de NO) [77], e sobre função diastólica do ventrículo esquerdo são os inibidores da fosfodiesterase 5.

Para os pacientes nos quais todas as etapas foram cumpridas e ainda assim o alvo terapêutico não foi atingido, novas opções terapêuticas envolvendo terapia intervencionista tem apresentado resultados promissores. Os principais procedimentos são a denervação simpática renal [50] e ativação de barorreflexo carotídeo por eletrodos implantáveis nos seios carotídeos [78]. Acredita-se que hiperativação do sistema nervoso simpático determina cerca de 50% de todos os tipos de hipertensão e um desbalanço entre a modulação parassimpática e simpática está presente em todos os pacientes hipertensos. Estes são os principais alvos para o tratamento intervencionista: melhorar o fluxo sanguíneo renal e a modulação autonômica dos pacientes hipertensos resistentes.

1.5 Disfunção Diastólica do Ventrículo Esquerdo (DDVE)

1.5.1 DDVE e HAR: Prevalência

Muitos dos sintomas determinados pela falta do controle da hipertensão arterial por longos períodos resulta diretamente de lesões de órgão-alvo. Para o coração, a disfunção diastólica—assim como a disfunção endotelial para os vasos— é uma das mais manifestações mais precoces de lesão de órgão-alvo. Esta complicação está associada a uma elevação independente na mortalidade de 8 a 10 vezes em seus estágios iniciais (antes da alteração de complacência ventricular) [79, 80]. Outrossim, precede o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda [81, 82] e de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada, entidade comum que corresponde a cerca de 50% do total de casos de insuficiência cardíaca [79, 83, 84].

A prevalência de disfunção diastólica em hipertensão arterial essencial atinge cerca de 50% [79, 85] e amplia-se para até 95% em hipertensão resistente [15]. O problema é ainda mais grave dado que não existe tratamento específico até o momento. A melhora da função diastólica, quando observada, tem sido atrelada à redução da PA e controle de outros elementos fisiopatológicos, como rigidez arterial [86], hiperatividade simpática (por denervação renal) [87] e redução da resistência periférica vascular [88].

1.5.2 DDVE: Fisiopatologia

O desempenho ideal do ventrículo esquerdo depende de sua capacidade de alternar-se entre dois estados: 1) uma câmara complacente durante a diástole que permite que o ventrículo seja preenchido mesmo a partir das baixas pressões atriais; e 2) uma câmara rígida que eleve rapidamente a pressão durante a sístole para ejetar o volume sistólico a pressões arteriais (Figura 1). Além disso, o volume sistólico deve aumentar em resposta a demandas fisiológicas, como

atividade física e estados hiperdinâmicos, sem que se altere muito a pressão atrial [89]. A função diastólica especificamente depende de dois parâmetros essenciais: relaxamento ativo do miocárdio e propriedades passivas da parede ventricular. O primeiro é modulado por: pré- e pós-carga [90]; inativação (mecanismos relacionados a homeostase do cálcio) e propriedades dos miofilamentos [88, 89]; e sincronia (relaxamento precoce em alguns segmentos associado a encurtamento pós-sistólico de outros segmentos pode determinar disfunção diastólica [91]). O segundo depende dos cardiomiócitos *per se* (principalmente o citoesqueleto) e a matriz extracelular cardíaca; que dependem da interação cíclica ideal dos miofilamentos e de valvas mitral e aórtica competentes.

A principal consequência fisiopatológica da disfunção diastólica é o aumento das pressões de enchimento ventricular [89]. Estas são consideradas acima do limite quando a pressão de artéria pulmonar ocluída for > 12 mmHg ou a pressão diastólica final (PDF) do ventrículo esquerdo for > 16 mmHg [92]. Pressões de enchimento são determinadas principalmente pelas propriedades passivas da parede ventricular esquerda, mas também por um relaxamento incompleto do miocárdio e variações do tônus diastólico do miocárdio.

1.5.3 Modulação Aguda da Função Diastólica

Diversos estímulos podem influenciar a função diastólica, porém a maior parte da literatura específica trata apenas da modulação crônica. Na última década, a modulação neuro-humoral da função diastólica tem sido alvo de intensa investigação. Até o momento, a maior parte da documentação científica melhor descreve o sistema adrenérgico como modulador agudo da função diastólica (e sistólica) [93]. Porém, peptídeos como a endotelina e angiotensina-II—além de seus efeitos crônicos deletérios—também têm efeitos agudos sobre o relaxamento ativo do miocárdio e suas propriedades passivas [94, 95]. O NO também tem um papel agudo na

diástole, descrito em meados da década de 90, mas que foi reforçado com estudos mais recentes [96-102]

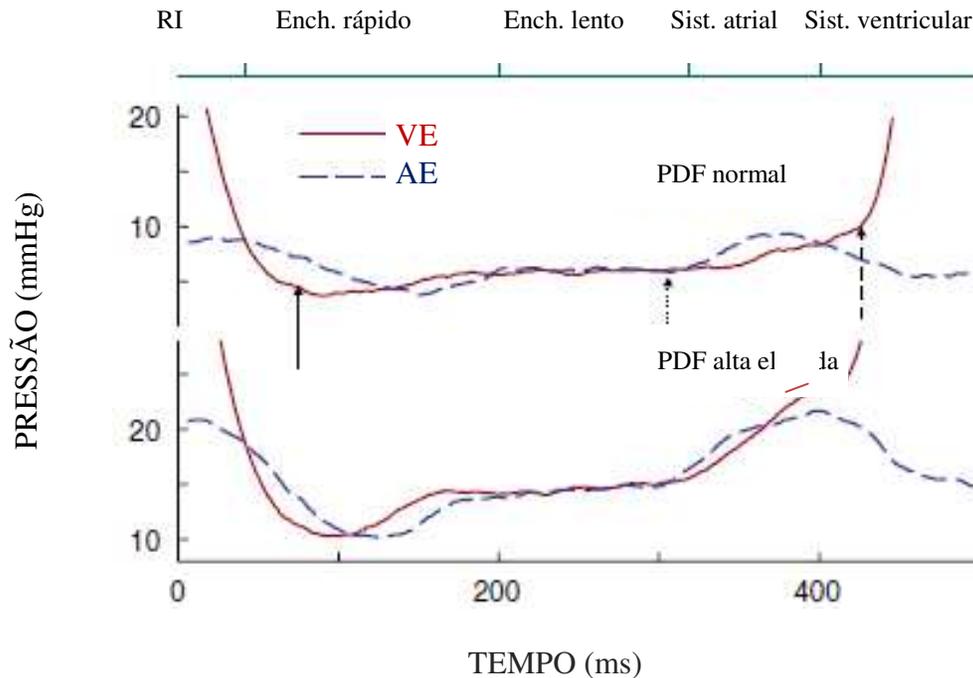


Figura 1. As quatro fases da diástole são apresentadas em relação as pressões do átrio esquerdo (AE) e do ventrículo esquerdo (VE) em cães anestesiados. O primeiro cruzamento de pressão corresponde ao fim do relaxamento isovolumétrico e abertura da válvula mitral. Na primeira fase, a pressão atrial esquerda excede a pressão do ventrículo esquerdo, acelerando o fluxo mitral. O pico da onda corresponde aproximadamente ao segundo cruzamento de pressão. A partir daí, a pressão ventricular esquerda excede a pressão atrial esquerda, desacelerando o fluxo mitral. Estas duas fases correspondem ao enchimento rápido (onda E mitral). Segue-se o enchimento lento do VE, com quase nenhuma diferença de pressão entre as duas câmaras. Em seguida, durante a contração atrial, a pressão atrial esquerda novamente excede a pressão ventricular esquerda (onda A mitral). A seta sólida aponta para a pressão ventricular esquerda mínima, a seta pontilhada para a pressão ventricular esquerda pré onda A a pressão e a seta tracejada para a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. O painel superior foi registrado a uma pressão final diastólica normal de 8 mmHg. O painel inferior foi registrado depois de uma sobrecarga de volume e a uma pressão diastólica final de 24 mmHg. Note as diferenças de pressão—maiores nos traçados do painel inferior—refletindo uma diminuição da complacência do AE e VE. A contração atrial provoca um forte aumento da pressão ventricular esquerda e a pressão atrial esquerda dificilmente ultrapassa essa pressão elevada ventricular esquerda. RI: relaxamento isovolumétrico; PDF: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. (Modificado de Gillebert TC e Leite-Moreira AF).

1.5.3.1 Homeostase do Cálcio na Diástole

A interação cíclica dos miofilamentos determina o ciclo de contração-relaxamento. Contração e relaxamento pertencem ao mesmo processo molecular de ativação transitória do miócito e estão intrinsecamente interligados [103]. No âmbito molecular, a homeostase do cálcio desempenha um papel determinante no relaxamento do miocárdio [88]. Com efeito, a extrusão de cálcio citosólico é crucial para uma diástole normal, e os mecanismos que contribuem para reduzir os níveis de cálcio intracelular estão alterados na disfunção diastólica. No coração humano, os principais processos responsáveis pela extrusão de cálcio são a sua captação pela bomba cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e a atividade da bomba sarcolemal de sódio-cálcio.

A atividade da bomba SERCA é inibida pela forma desfosforilada da proteína fosfolamban (PLB). A fosforilação da PLB promove uma aceleração do relaxamento miocárdico (ao remover seu efeito inibitório sobre a SERCA). Desta forma, o aumento da atividade da SERCA pela ativação direta ou pela fosforilação de PLB por proteínas quinases permite uma melhora na função de relaxamento do miocárdio.

1.5.3.2 Influência das Proteínas do Sarcômero na Diástole

As principais proteínas reguladoras dos miofilamentos, como a troponina e a proteína C de ligação à miosina, também desempenham um papel na modulação das propriedades diastólicas cardíacas. A fosforilação da troponina I (Tn-I) pela fosfoquinase A (PKA) [104], fosfoquinase C (PKC) [105] e fosfoquinase G (PKG) [106] reduz a sensibilidade miofilamental ao cálcio resultando em maior relaxamento. Esta dessensibilização de miofilamentos induzida pela PKA requer a presença de outra proteína sarcomérica, a proteína C de ligação à miosina [107]. Esta

última parece ser uma importante mediadora da diástole, mas uma compreensão mais completa deste processo ainda é necessária.

A titina é uma proteína sarcomérica gigante cada vez mais reconhecida como determinante da rigidez do miocárdio e contribuinte na fisiopatologia da insuficiência cardíaca [108]. De fato, a rigidez passiva pode ser modificada pela modulação das propriedades mecânicas da região expansível da titina, principalmente por fosforilação e alterações nos níveis de cálcio intracelular. Fosforilação (PKA-dependente) da seqüência única N2B da titina reduz a tensão passiva de cardiomiócitos em animais [109] e humanos [101]. Isto representa um dos mecanismos que contribuem para a melhoria das propriedades diastólicas cardíacas sob estimulação beta adrenérgica. Um trabalho recente [110] sugere que a PKC também pode fosforilar a titina, mas neste momento não está claro se apenas a PKA pode fosforilar a titina ou se a PKC também possui um papel. O cálcio e a proteína S100A1, uma proteína de ligação ao cálcio, também contribuem para a modulação da rigidez passiva do miocárdio. Juntas, elas inibem a interação da titina-actina (de maneira cálcio-dependente), um dos fatores determinantes da rigidez passiva dos miócitos, [111]. No entanto, trabalhos futuros são necessários para esclarecer a variedade de mecanismos rápidos de ajuste envolvendo a titina, bem como para compreender o seu papel fisiológico na modulação da função diastólica.

1.5.3.3 Óxido Nítrico e Função Diastólica

As observações iniciais sobre os efeitos de NO, em músculos papilares isolados, foram descritos como um efeito aceleração-relaxamento, caracterizado por redução no pico da tensão isométrica devido a um início mais precoce do relaxamento. Estes resultados também foram demonstrados em experimentos utilizando um modelo de coração animal inteiro, nos quais NO exógena e endógena, ambos, induziram uma taxa mais rápida de relaxamento do miocárdio [97,

98]. Os mesmos efeitos foram observados, *in vivo* (em coração humano normal), por meio de injeção intracoronária de nitroprussiato de sódio durante cateterização cardíaca [96].

Um efeito diastólico interessante do NO foi demonstrado em 1994, em cardiomiócitos isolados [99] e no ventrículo esquerdo humano intacto [96]. O NO promoveu um deslocamento das curvas de tensão-distensão e de pressão-volume do VE (durante a diástole) para a direita. Estes resultados indicam claramente que a sinalização por NO favorece maior distensibilidade de cardiomiócitos e maior complacência do VE. Esses estudos são corroborados por outros nos quais em corações de animais a presença de NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) ou de L-nitro arginina metil-éster (L-NAME) (inibidores exógenos específicos da sintase de NO) promoveu elevação da pressão diastólica final do VE [112, 113]. Em humanos, a dimetilarginina assimétrica (um inibidor endógeno da sintase de NO) foi associada a disfunção diastólica do ventrículo esquerdo em pacientes com insuficiência cardíaca sistólica [114, 115].

Devido à elevada concentração de GMPc miocárdica induzida pelo NO, um dos mecanismos sugeridos para mediar o aumento da distensibilidade diastólica é a fosforilação de Troponina-I pela PKG, que induziria redução da sensibilidade do cálcio miofilamentar [100]. Outra possível via para explicar o efeito observado seria a fosforilação PKG-mediada da titina [101].

Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que o NO é, provavelmente, um importante regulador da função diastólica em uma interação complexa aguda que inclui: melhora da perfusão e da função endotelial coronariana; e do desempenho diastólico do VE, por meio de aceleração do início do relaxamento e aumento da distensibilidade dos miócitos. Agudamente, a elevação da carga de trabalho cardíaco e/ou da tensão de cisalhamento endotelial promove liberação de NO que otimiza a função diastólica do VE (pelo prolongamento do intervalo de

tempo de diástole) e permite que o VE acomode volumes maiores a pressões de enchimento mais baixas.

1.5.4 Avaliação da Função Diastólica do Ventrículo Esquerdo

O ecocardiograma é o método diagnóstico mais utilizado na avaliação da função diastólica por tratar-se de método não invasivo e passível de ser realizado à beira do leito (figura 2). A função diastólica é definida partindo-se da análise por Doppler do fluxo diastólico através do orifício da valva mitral. Esta análise fornece, em vigência de ritmo sinusal, as velocidades e duração da onda E (enchimento rápido ventricular), onda L (enchimento lento ou diástase; apenas ocasionalmente visualizada) e onda A (fluxo de contração atrial); além do tempo de desaceleração da onda E e o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) do VE. A onda E reflete o gradiente de pressão AE-VE durante a diástole inicial e, portanto, é afetada pela pré-carga cardíaca e alterações do relaxamento do VE [116]. Já a onda A traduz o gradiente AE-VE na diástole tardia, afetada pela complacência do VE (i.e., relação pressão/volume do VE) e pela função atrial. O TRIV, como a onda E, também é afetado pelos volumes sistólicos e diastólicos finais e pelas pressões diastólicas do VE [117]. No entanto, padrões de enchimento do VE têm uma relação em forma de U com a função diastólica do VE, de modo que valores semelhantes podem ser observados em indivíduos normais saudáveis e em pacientes com doença cardíaca requerendo um complemento para a avaliação destes parâmetros.

A avaliação da função diastólica utiliza-se do recurso do Doppler tecidual do anel mitral. Esta ferramenta estima as velocidades de movimentação durante a fase de enchimento rápido (ondas e' septal e lateral) e durante a contração atrial (ondas a' septal e lateral) e de movimentação durante a contração ventricular sistólica (ondas s' septal e lateral) do anel mitral em suas porções septal e lateral [118]. Em pacientes com cardiopatia estabelecida a relação E/e'

tem as melhores correlações com pressões de enchimento do VE e índices invasivos de enrijecimento do VE [119, 120]. Existem outros parâmetros disponíveis para dirimir possíveis incertezas no diagnóstico, como a velocidade de propagação do fluxo da valva mitral (por meio do modo-M colorido) e as velocidades do fluxo da veia pulmonar [117, 118].

Adicionalmente, o volume do átrio esquerdo (VAE), a partir do modo bidimensional (nas janelas apical 2 câmaras e apical 4 câmaras) fornece um índice de função diastólica de grande acurácia e reprodutibilidade [121]. A vantagem é que complementa as avaliações das velocidades por Doppler e do TRIV. Enquanto estes últimos refletem as pressões de enchimento do VE no momento de sua avaliação (ou seja, instantaneamente) o VAE reflete os efeitos cumulativos da pressão de enchimento no decorrer do tempo [117].

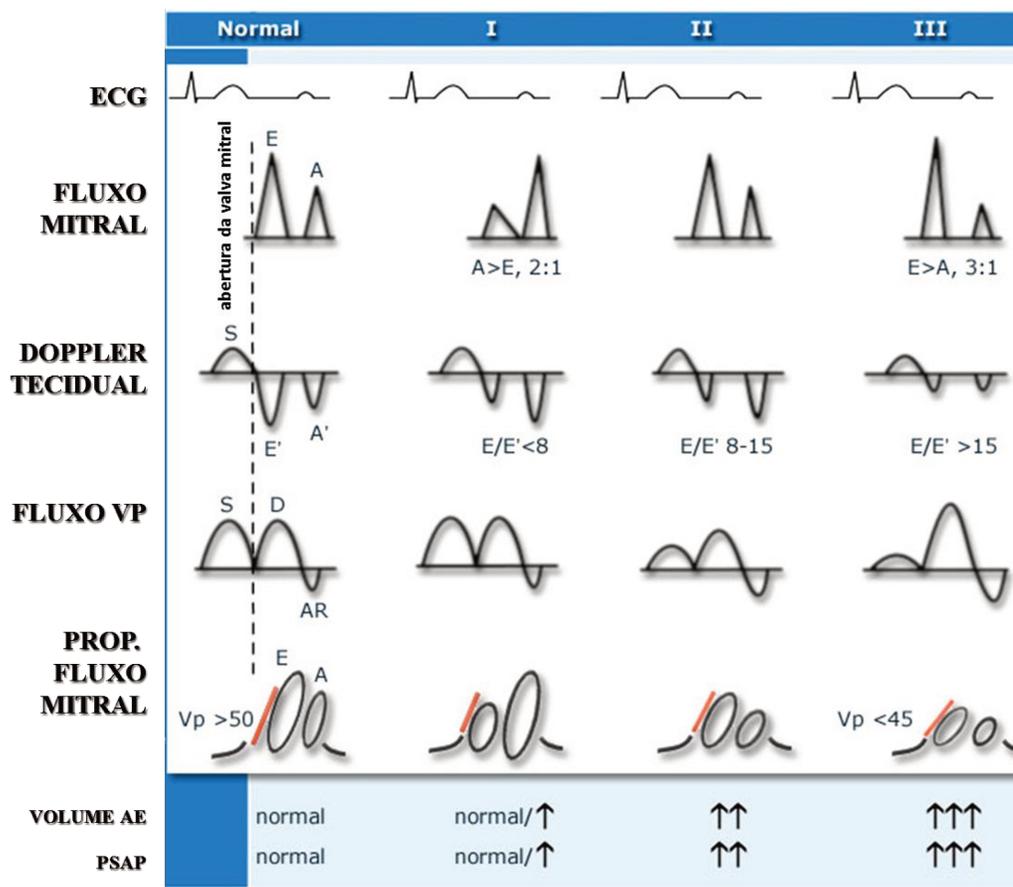


Figura 2. Avaliação e fases da disfunção diastólica do VE. I: alteração de relaxamento do VE, II: disfunção diastólica moderada (pseudonormal), III: padrão restritivo de enchimento do VE reversível (alteração da complacência; reversível à manobra da Valsalva); IV (não representada): padrão restritivo de enchimento do VE não reversível (alteração da complacência; não reversível à manobra da Valsalva). ECG: eletrocardiograma; VP: fluxo venoso pulmonar; AE: átrio esquerdo; PSAP: pressão sistólica da artéria pulmonar; VE: ventrículo esquerdo.

1.6 Endotélio

Os vasos sanguíneos estão revestidos internamente por uma camada tênue de células denominada ‘endotélio’. Esta camada constitui um órgão multifuncional, essencial para fisiologia cardiovascular normal. Quando disfuncionante favorece a fisiopatogenia da doença cardiovascular [122, 123]. Anatomicamente o endotélio limita o compartimento intravascular. Esta interface executa um considerável número de funções vitais [124-126]. Entre elas:

- 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 (VGEF), 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 NO, inibindo a agregação, a adesão e a 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 [127, 128];
- e) Inibição da proliferação celular da musculatura lisa vascular impedindo a migração de células musculares lisas através de mecanismos diretos, como a síntese de NO, 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. [129-131];

g) Participação na degradação e na 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, [132]) na macrocirculação, particularmente, pelo NO; e na microcirculação, principalmente, pela prostaciclina, bradicinina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), metabólitos das monoxigenases e outras [133-138].

1.6.1 Óxido Nítrico (NO)

O NO é uma substância não prostanóide, lábil e difusível, mediadora do relaxamento dependente do endotélio [135]. Formada a partir do nitrogênio-guanidino terminal do aminoácido L-arginina, pela enzima NO sintase (NOS). Três tipos de NOS são conhecidos: duas formas constitutivas (cNOS) e uma forma indutível (iNOS) [139]. Na célula endotelial ocorre a NOS endotelial (eNOS) que é constitutiva (NO sintase III). Esta enzima produz o NO em duas etapas de oxidação, utilizando o oxigênio molecular (O_2). 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 O_2).

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 hidrobiopterina (HB) para ótima atividade. A enzima pode

ser inibida de forma competitiva por análogos exógenos da L-arginina, como L-NMMA e L-NAME.

Para exercer seu efeito de vasodilatação—particularmente em artérias musculares—o NO difunde-se em direção às células musculares lisas vasculares e as relaxa pela ativação da enzima citosólica guanilato ciclase solúvel (GCs). Esta, por sua vez aumenta a disponibilidade do segundo-mensageiro GMP cíclico intracelular [140-142], a partir da conversão da guanosina-5'-trifostato (GTP). O aumento de GMPc (cuja ação nos tecidos de mamíferos é mediada sobretudo pela proteína quinase G) diminui o influxo de cálcio para o citoplasma e aumenta a captação do íon pelo retículo sarcoplasmático (por meio de Ca^{++} /ATPase-SERCA) ou interage diretamente com as proteínas contráteis, tais como a titina e a troponina I [143, 144].

Adicionalmente, o NO pode causar relaxamento muscular por interação direta com canais de potássio; além de regular a produção de endotelina-1 nas células endoteliais (efeito mediado pelo aumento de GMPc) [144]. Finalmente, o NO também pode regular o tono vascular através de interações complexas com hemoglobina proveniente de glóbulos vermelhos, glutatona e pequenos grupos tióis [145, 146].

A produção de NO é a maior contribuinte do relaxamento dependente do endotélio em grandes artérias isoladas, incluindo coronárias, artérias mesentéricas, pulmonares e cerebrais. A manutenção basal do tono vascular ocorre devido à liberação contínua de NO pelas células endoteliais. Seu significado *in vivo* é sugerido pelas observações de que os inibidores da eNOS causam vasoconstrição em muitos leitos vasculares e um aumento da PA sistêmica em animais e humanos [147, 148].

A liberação de NO é modulada por estímulos físicos e humorais. Entre os estímulos físicos cita-se a pressão hidrostática transmural, o estiramento circunferencial e as forças de

cisalhamento produzidas pelo atrito da onda de fluxo sanguíneo na parede arterial—este, um dos principais fatores reguladores da liberação local de NO *in vivo* [149, 150]; [150]). Fatores humorais que estimulam a liberação de NO são: hormônios circulantes, como catecolaminas e vasopressina; autacóides, como a bradicinina e a histamina; e mediadores liberados pelas plaquetas (serotonina e adenosina difosfato - ADP) ou formados durante a coagulação (trombina) [151]. Outrossim, alguns hormônios e drogas que alteram os níveis intracelulares de cálcio podem interferir na sua produção e liberação.

1.6.2 Disfunção Endotelial

A disfunção endotelial é uma condição patológica sistêmica [152] na qual existe um desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras, antimitogênicas e antitrombogênicas (fatores relaxantes derivados do endotélio [153]) e substâncias vasoconstritoras, pró-trombóticas e com propriedades proliferativas (fatores constrictores derivados do endotélio, como catecolaminas, angiotensina II e endotelina-1 [154]).

Esta condição estende-se além do comprometimento do tônus da musculatura lisa do vaso. O NO também inibe diversos processos pró-aterogênicos, como a migração e proliferação de células musculares lisas, a agregação plaquetária, a oxidação do LDL-colesterol, adesão de monócitos e plaquetas e a síntese de citocinas inflamatórias. Em condições fisiológicas a ação conjunta destes fatores promove, além da manutenção tônus vascular normal e da fluidez do sangue, a limitação do processo inflamatório arterial e a proliferação de células musculares lisas [155].

De forma geral, a redução da biodisponibilidade de NO indica um fenótipo disfuncional permeando todas as propriedades do endotélio. A maioria, se não todos, os fatores de risco cardiovascular estão associados a esta condição [156, 157] e a modificação do risco gera melhora

da função do endotélio. E, talvez mais importante, a disfunção endotelial ocorre precocemente no curso da vida, quando associada a fatores de risco, antecedendo o desenvolvimento das alterações morfológicas promovidas pela aterogênese [158]. Portanto, a sua detecção tem potencial benefício clínico para a prevenção da doença aterosclerótica cardiovascular estabelecida.

1.6.3 Avaliação da Função Endotelial

1.6.3.1 Vasodilatação Mediada por Fluxo (VMF)

Como enumerado, previamente, três tipos de forças mecânicas primárias promovem ativação das células endoteliais: 1) pressão intravascular hidrostática; 2) tensão circunferencial, pelo estiramento das junções intercelulares endoteliais e 3) forças de cisalhamento, pelo contato tangencial da coluna sangüínea sobre a superfície endotelial. Esta última é o mais potente estímulo fisiológico para produção de NO pela célula endotelial. Incrementos rápidos e agudos da produção de NO são secundários à ativação pós-traducional da óxido-nítrico sintase constitutiva endotelial (eNOS), enquanto alterações crônicas estão relacionadas a alterações da expressão gênica da eNOS [159-161].

Para avaliar a função endotelial pode-se induzir um aumento de fluxo, que é produzido por compressão e descompressão vascular. Após a liberação do fluxo a coluna de sangue promove uma força de “cisalhamento” sobre a parede vascular. O fluxo detectado por mecanossensores endoteliais levam à produção e à liberação de substâncias vasodilatadoras, incluindo o NO. Dessa forma, pode-se mensurar a dilatação da artéria em estudo (expressa em % de incremento do diâmetro em relação ao basal), mediada por NO [162]. A diminuição desta dilatação (dependente do endotélio), que é mediada pela via NO-GMP cíclico, é interpretada como alteração funcional da célula endotelial. Em contrapartida, doadores de NO, como a nitroglicerina (NTG) e o nitroprussiato de sódio, agem diretamente sobre a musculatura lisa

vascular promovendo dilatação sem o intermédio da produção de substâncias vasodilatadoras pelo endotélio (não-dependente do endotélio) [163]. Isso permite uma avaliação teórica da célula muscular lisa vascular.

O posicionamento do manguito proximal ou distal em relação à artéria avaliada (geralmente, a artéria braquial) parece ter significados fisiológicos diferentes. No caso da artéria braquial, quando o manguito é inflado em torno do antebraço (distal à artéria) a força de cisalhamento produzida determina uma resposta largamente mediada por NO (cerca de 100%). Por outro lado, com o manguito ao redor do braço (proximal à artéria), a contribuição do NO à vasodilatação é de apenas cerca de 40% atribuindo-se a contribuição restante a outras substâncias vasodilatadoras (prostaglandinas [164], acetilcolina, entre outras [165]). Apesar desta diferença, ambos os procedimentos são igualmente preditores precoces de eventos cardiovasculares [166].

1.6.3.2 Marcadores Plasmáticos de NO

O nitrato plasmático tem sido usado com maior frequência como marcador de formação de NO. Contudo, as concentrações de nitrato plasmático podem ser influenciadas pela síntese de nitrato por bactérias no intestino, por enzimas desnitrificantes hepáticas, pela formação de saliva e óxidos de nitrogênio do ambiente [167, 168] entre outros. Além disso, as altas concentrações basais de nitrato no plasma podem dificultar a detecção de pequenas variações de NO [167]. Portanto, tem sido proposto que o nitrito plasmático e no sangue total reflitam melhor a formação de NO endógeno, uma vez que estão associados à atividade da NO sintase [169-171].

1.6.4 Características das Sintases de Óxido Nítrico

Há dois subtipos de cNOS: uma foi detectada inicialmente no endotélio vascular e é chamada de NOS endotelial (eNOS) [172] e a outra se encontra nos sistemas nervoso central e periférico e constitui a NOS neuronal (nNOS) [173-178].

A nNOS é expressa no cérebro, medula espinhal, gânglios simpáticos, nervos nitrérgicos periféricos, glândulas adrenais [179] células epiteliais do útero, pulmão e estômago, plaquetas e células das ilhotas do pâncreas, dentre outros tecidos [180]. A iNOS pode ser induzida por lipossacarídeos, toxinas de bactérias e citocinas nos macrófagos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos e células da musculatura lisa vascular [181]. A eNOS é bastante expressa nas células endoteliais, sendo também expressa em plaquetas, cardiomiócitos e outros tipos celulares [182]).

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

1.6.5 NO Sintase Endotelial (eNOS)

1.6.5.1 Estrutura e localização da eNOS

A eNOS é um dímero que consiste de dois monômeros 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 [172]).

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) [184]). 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 [185, 186].

A eNOS se localiza, no mínimo, em três compartimentos celulares: o aparato de Golgi, a membrana citoplasmática e a cavéola [187]). A translocação da eNOS da região intracelular para o citosol em resposta a agonistas tem sido controversa. 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 [188].

1.6.5.2 Regulação da Atividade e Expressão da eNOS

A eNOS é funcional apenas sob a forma dimerica. A dimerização de eNOS se inicia com sua ligação ao heme [189]). A estabilização do dímero depende de tetrahydrobiopterina (BH₄) [190]), além de íons zinco, os quais mantêm a integridade dos sítios de ligação BH₄ [191]).

Os monômeros que compõem os dímeros da eNOS ativos são miristoilados e palmitoilados 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 fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) [192].

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 [193, 194]. Embora a eNOS seja considerada como uma NOS expressa constitutivamente, vários fatores afetam sua expressão basal e atividade enzimática, como a hipóxia [195], hormônios, como o

estrógeno [196], oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL oxidadas) [197], forças de cisalhamento e forças mecânicas [198]. Esses fatores podem induzir a transcrição de eNOS, por exemplo, ao ativar a AP-1 durante a hipóxia, ou podem levar à ativação da eNOS por aumento do cálcio intracelular [195].

A eNOS pode no entanto, 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 [149, 150]. 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 [199]).

A produção de NO endotelial não é exclusivamente dependente da expressão da enzima 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 [200, 201].

1.6.5.3 Polimorfismos Clinicamente Relevantes da eNOS

A enorme importância do NO na manutenção da homeostase do sistema cardiovascular estimulou a procura de variações no gene (polimorfismos) que codifica a eNOS. Estas variações poderiam explicar diferentes níveis de atividade desta enzima e, possivelmente, um maior risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como hipertensão, espasmo coronariano, doenças cerebrovasculares, pré-eclâmpsia, trombose venosa profunda e infarto agudo do miocárdio [202-208].

O gene da eNOS apresenta diversos polimorfismos conhecidos atualmente. Estes polimorfismos estão presentes na região promotora (SNPs nas posições -786, -924, -1474) [209, 210]; [210]), na região codificadora do DNA (C774T, G894T) [211]) e 5 nos íntrons 2, 11, 22 e

23 [210]) um VNTR de 27 pares de bases no íntron 4 e uma repetição de CA no íntron 13 [212]).

Destes, três polimorfismos tem sido mais amplamente estudados: 1) um SNP da região promotora (T-786C), que pode conter uma base timidina (T) (alelo mais comum) ou citosina (C) (alelo mais raro); 2) um SNP no éxon 7 (Glu298Asp ou G894T) que ocorre devido à substituição do nucleotídeo guanina (G) pelo nucleotídeo T na posição 894 do gene da eNOS, resultando na conversão do glutamato em aspartato na posição 298 da estrutura protéica da enzima [213]; e 3) um número variável de repetições em tandem de 27 pares de bases (VNTR) no íntron 4, os alelos mais frequentes apresentam 4 cópias (variante a, mais raro) ou 5 cópias (variante b, mais comum) [172].

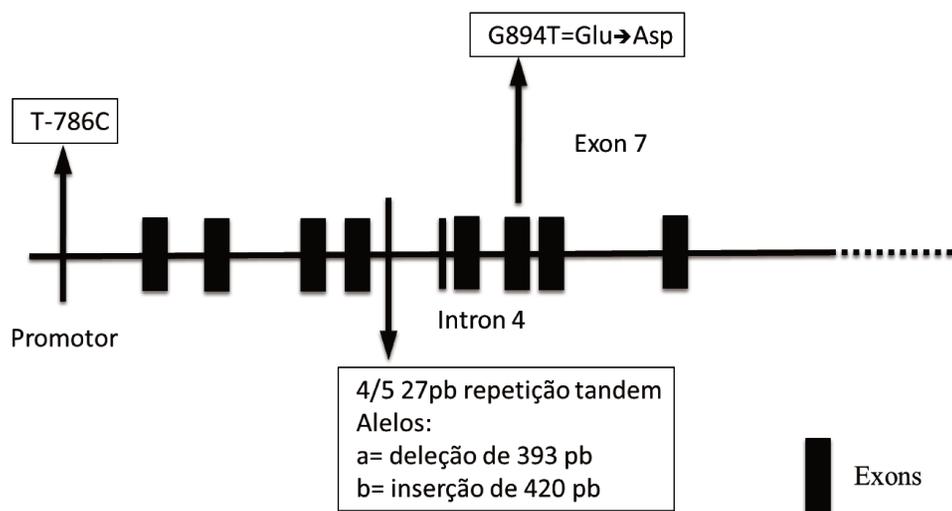


Figura 3. Localização dos principais polimorfismos da eNOS (setas). O gene da eNOS está localizado no cromossoma 7q35-36 e é composto por 26 éxons e íntrons (sequências entre éxons). Pb: pares de base.

1.6.5.3.1 Polimorfismo T-786C e Implicações Clínicas

O polimorfismo T-786 C - resultante da substituição de uma timidina por uma citosina no nucleotídeo -786, região promotora do gene da eNOS - aumenta o risco de espasmo coronariano [209], hipertensão [214, 215] e infarto do miocárdio [216]. Adicionalmente, foi identificada menor produção plaquetária de NO em indivíduos portadores do alelo C que em indivíduos não portadores deste alelo [217]. Investigações prévias indicam que a presença do alelo C reduz em aproximadamente 50% a atividade do gene promotor da eNOS, bem como os níveis celulares de RNA mensageiro, e por conseguinte a biodisponibilidade de NO (em cerca de 25%) [209, 218-220]. A prevalência da variante C deste polimorfismo em brasileiros brancos e negros saudáveis não é incomum (41,9 e 19,5%, respectivamente) [221] e assemelha-se à relatada para a raça caucasiana e afro-americana (42,0 e 17,5%, respectivamente) norte-americana [222].

No entanto, estudos de associação entre variantes da eNOS e doenças cardiovasculares particularmente hipertensão arterial têm mostrado resultados discrepantes. Alguns estudos mostraram associação entre polimorfismos da eNOS e hipertensão arterial em diferentes grupos étnicos [214, 223-236], porém outros não confirmaram esses achados [237-246]. Assim, ainda não existe consenso entre os diferentes estudos para consolidar a associação entre eNOS e hipertensão arterial. As possíveis causas destas discrepâncias provavelmente devem-se: 1) ao baixo poder estatístico destes estudos que esta estreitamente relacionada ao tamanho da amostra; 2) aos critérios de seleção e exclusão como idade, presença de pseudo-hipertensão, hipertensão do jaleco branco ou hipertensão secundária não diagnosticada; 3) ao fato de se tratar de uma doença poligênica, 4) ao fato de um poder ser mascarado por outro 5) à estratificação populacional ou diversidade étnica [222, 247]; e 6) foco na contribuição de apenas um polimorfismo par uma condição clínica específica.

Existe ainda, uma possível modulação da resposta a determinados fármacos pelos polimorfismos da eNOS. Células endoteliais com genótipo CC tratadas com estatinas apresentaram maiores níveis de mRNA para eNOS que as células portadoras do genótipo TT [248]. Tal fato deve-se, provavelmente, ao aumento da taxa transcricional, da estabilidade do mRNA para eNOS e da diminuição da expressão da proteína repressora RPA1 promovida pela estatina de forma mais significativa nas células portadoras do alelo C. Similarmente, voluntários sadios portadores do genótipo CC recebendo atorvastatina tiveram maior aumento da biodisponibilidade do NO, diminuição do estresse oxidativo e redução significativa de marcadores inflamatórios (CD40L, VCAM-1, P-selectina e MMP-9) que indivíduos TT [249, 250]. Tais achados indicam que essa estatina poderia ser mais relevante para a prevenção de eventos cardiovasculares em indivíduos com o genótipo “CC” do que em indivíduos com genótipo “TT”. Posteriormente, foi observado que tratamento de curto prazo com atorvastatina reduz a fluidez da membrana eritrocitária em indivíduos CC, mas não nos indivíduos TT [251]. Mais recentemente, foi demonstrado que indivíduos com disfunção erétil pós-operatória, portadores do alelo C, respondem melhor ao tratamento com sildenafil que os voluntários portadores do alelo T [252]. Em relação à resposta a drogas anti-hipertensivas, foi demonstrado que pacientes portadores do alelo C tiveram melhor resposta ao enalapril quando comparados aos do grupo TT quando tratados por um período de 60 dias. Sabe-se que, em parte, a resposta anti-hipertensiva determinada pelo uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina é atribuída a um aumento da biodisponibilidade de NO. Portanto, é perfeitamente plausível que haja um efeito modulatório do polimorfismo T-786 C em drogas que atuem na via do NO.

1.7 Fosfodiesterases

As fosfodiesterases (PDEs) foram descritas pela primeira vez por Sutherland e colaboradores [253, 254]. A superfamília de PDEs é dividida em duas maiores classes, I e II [255]. Na classe I estão incluídas todas as PDEs conhecidas e identificadas em mamíferos e compreendem 11 famílias de enzimas (PDE1 – PDE11), originadas a partir de genes distintos [256-265]. Algumas famílias de PDE são relativamente específicas para AMPc (PDE 4, 7, 8) ou para GMPc (PDEs 5, 6, 9); outras hidrolisam ambas (PDEs 1, 2, 3, 10, 11) [266]. Todas as PDEs da classe I são diméricas. Para regular sua ativação, elas têm um domínio catalítico (com aproximadamente 270 aminoácidos) localizado na porção carboxi-terminal [267, 268].

Múltiplos genes abrangem cada família de PDE e amplificam estas isoenzimas para mais de 50 variantes distintas [258, 266, 269-276]. Além disso, cada família, e os componentes dentro da família, diferem-se com relação: ao padrão de distribuição tecidual, celular e subcelular; à especificidade de substrato; e à regulação pelas proteína-quinases (PKs) e proteínas ligantes. Conseqüentemente, as PDEs estão normalmente envolvidas em processos fisiológicos e patológicos específicos, tais como ereção peniana, asma, hipertensão pulmonar, aterosclerose, vasodilatação, insuficiência cardíaca e diabetes.

Estes efeitos ocorrem pela catalização da terminação dos segundos-mensageiros ativos intracelulares—por hidrólise da banda fosfodiéster, entre os átomos de P e O na posição 3', com inversão da configuração no átomo de P [277, 278]—mediada pelas PDEs. Assim, há conversão de AMPc ou GMPc em seus correspondentes monofosfatos (AMP ou GMP) [279].

1.7.1 GMPc

As concentrações intracelulares de GMPc são controladas pelo equilíbrio entre sua síntese em resposta a sinais extracelulares e sua hidrólise pelas PDEs. Embora muitos dos efeitos do

GMPc sejam mediados pela ativação de proteínas kinases (PKs) dependentes destes nucleotídeos cíclicos [280], diversos outros efeitos já são conhecidos.

O GMPc regula respostas fisiológicas tais como vasodilatação, secreção intestinal e fototransdução retiniana e exerce seus efeitos através da ativação de diferentes efetores, tais como canais iônicos dependentes de GMPc [281], PKs mediadas por GMPc [282] e PDEs [266, 283]. O início da cascata de sinalização ocorre com a ativação da guanilato ciclase (GC) e conversão de GTP em GMPc. Este é subsequentemente convertido em GTP por ação da PDE5.

No sistema vascular, em condições fisiológicas, a vasodilatação de veias e artérias é mediada pelo GMPc [284], através da modulação dos canais de cálcio [285], resultando em diminuição da pré- e pós-carga [286]. A inibição da sua degradação aumenta o fluxo sanguíneo coronário em corações hipoperfundidos durante isquemia induzida por exercício [287]. No coração o GMPc exerce efeitos inotrópicos negativos [288, 289], reduz o influxo de cálcio [290], encurta a duração do potencial de ação [291] e inibe os potenciais de ação dependentes de Ca^{+2} [292-294].

A via de sinalização NO/GMPc/PKG foi tida inicialmente como restrita a certos tecidos e ações fisiológicas. Principalmente, por seus efeitos no relaxamento do músculo liso vascular e inibição da agregação plaquetária [295, 296]. Esse conceito tem sido contestado por muitos relatos que documentam o papel desta via de sinalização em diversos tecidos, mesmo em tecidos nos quais os níveis globais dos componentes de sinalização são baixos [297, 298]. Existe evidência crescente que a ativação de GMPc tem efeitos anti-hipertróficos cardíacos e anti-fibróticos. A resultante redução de cálcio intracelular reduziria a expressão de genes associados à hipertrofia cardíaca [299, 300].

1.7.2 Fosfodiesterase 5

A fosfodiesterase 5 (PDE5) é específica para GMPc [301, 302] (figura 3) e está presente em grandes concentrações em limitado número de tecidos, tais como: coração, músculo vascular sistêmico, corpo cavernoso do pênis, plaquetas e músculo liso visceral [303]. Assim, a inibição de PDE5 causa aumento de GMPc e efeitos sistêmicos [302]. A família da PDE5 consiste de um único gene PDE5 que pode codificar três isoformas distintas (PDE5A1-3) [304, 305] apesar de pouco se saber sobre os diferentes locais de expressão das variantes da PDE5 e as diferenças de suas ações [266, 302, 304-308].

Expressão de PDE5A1 foi detectada em tecido cardíaco de humanos, ratos e cães, apesar de ainda controverso [302, 304-308]. Nos cardiomiócitos, a PDE5 é primariamente encontrada nas bandas Z [309-311]. Elevação na atividade da PDE5 também tem sido associada à hipertrofia cardíaca, e supressão dessa atividade produziria um efeito anti-hipertrófico [309, 310, 312-314] . A maioria dos estudos sugerem que no coração normal, a PDE5 representaria <30 % da atividade de hidrólise de GMPc e a maioria dos estudos com pessoas saudáveis revelam uma resposta pequena ou qualquer resposta ao uso de inibidores de PDE5 [315, 316]. No entanto, estudos em animais e humanos, sugerem que sobrecarga cardíaca está associada ao aumento dos níveis de PDE5 de 2 a 6 vezes nos cardiomiócitos além de que desbalanços da atividade da PDE5 e da via de sinalização NO/GMPc/PKG estariam envolvidas na hipertrofia cardíaca, injúria cardíaca por sobrecarga de câmaras e lesão de isquemia-reperfusão [309, 310, 317-321]. Efeitos cardioprotetores com uso do citrato de sildenafil, têm sido descritos em alguns trabalhos experimentais [309, 322, 323], mas os mecanismos pelos quais isso acontece ainda não estão claramente elucidados.

A importância fisiológica da PDE5 na regulação do tônus do músculo liso tem sido demonstrada claramente por usos clínicos e experimentais do sildenafil, no tratamento da disfunção erétil [324]. Além disso, trabalhos recentes têm mostrado o envolvimento da PDE5 na manutenção do tônus [325, 326] e remodelamento vascular [287, 327]. Corroborando com estes resultados, alguma evidência sugere que o aumento de GMPc pelo uso de inibidores PDE5 pode ser protetor contra aterosclerose vascular [328] e que melhoraria a função endotelial [329, 330]

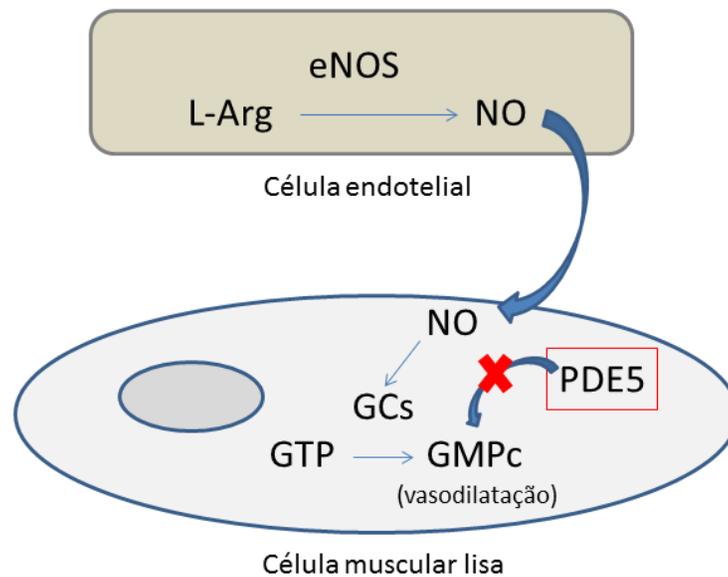


Figura 4. Via NO-GMPc e ação vascular da PDE5. NO: óxido nítrico; eNOS: NO sintase endotelial; L-Arg: l-arginina; GCs: guanilato ciclase solúvel; GTP: trifostato de guanosina; GMPc: monofostato de guanosina cíclico.

1.7.2.1 inibidores de Fosfodiesterase 5

O primeiro agente oral desenvolvido com ação inibidora da PDE5 foi o sildenafil. Este fármaco é rapidamente absorvido e seu início de ação ocorre de 30 min a 1 hora; com uma meia-vida plasmática relativamente curta de 4 horas [331, 332]. Em um estudo comparativo entre doses endovenosas (50 mg) e orais (50 mg), foi demonstrado que as concentrações plasmáticas de sildenafil oral declinam de forma bifásica com uma meia-vida terminal de 4,1 horas. A concentração em 24 horas após a administração foi ínfima ($0,8 \text{ ng.ml}^{-1}$) em relação ao pico

plasmático ($159 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). A biodisponibilidade oral absoluta (calculada pela razão da área sob a curva da dose oral/dose endovenosa) foi de 41% e a C_{max} de 30 % (também comparada a dose endovenosa). A meia-vida da droga por ambas as vias de administração foi semelhante [333].

No mesmo estudo foi realizado uma avaliação de dose-proporcionalidade, na qual foram administradas doses crescentes de sildenafil oral (25 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg) em datas separadas por pelo menos 7 dias ($n=32$) (tabela 2). Elevações da C_{max} e AUC foram proporcionais às doses administradas (figura 3). Para todas as doses, os níveis de C_{max} de UK-103,320 (metabólito do sildenafil após o efeito de primeira passagem hepática) ocorreram após cerca de 1 hora da administração confirmando a rápida biotransformação hepática do fármaco [333].

No que se refere à farmacodinâmica, os inibidores das PDE5 elevam os níveis intracelulares de GMPc—que são os substratos naturais para as PDEs—mimetizando sua estrutura. Agem, portanto, por mecanismos de competição [334, 335]. Porém, ao contrário do GMPc, estes inibidores não são degradados.

O sildenafil tem vários potenciais efeitos hemodinâmicos. Por via endovenosa (nas doses 20, 40, e 80 mg), reduz significativamente ($p < 0,01$) a PAS e PAD supina de indivíduos saudáveis (reduções médias de 7,0/6,9 e 9,2/6,7 mm Hg, para as doses de 40 e 80 mg, respectivamente). Interessantemente, essas quedas de PA foram transitórias e não foram proporcionais à dose [332]. Reduções modestas na resistência vascular sistêmica também foram observadas (redução máxima de 16%), embora a frequência cardíaca não tenha sido afetada pela administração de sildenafil quando comparado ao placebo (tabela 3). Doses orais únicas de sildenafil (100, 150 e 200 mg) não produziram alterações significativas do índice cardíaco em relação ao placebo (no período de 1 a 12 horas). A dose endovenosa de 80 mg e oral de 200 mg de sildenafil produziram níveis plasmáticos semelhantes [332].

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos de sildenafil seguindo administração oral de doses únicas de 25 a 200 mg (estudo de dose-proporcionalidade)

Sildenafil	25 mg	50 mg	100 mg	200 mg
AUC (ng.ml ⁻¹ .h)	361	738	1685	3755
AUC _t (ng.ml ⁻¹ .h)	334	727	1667	3702
C _{max} (ng.ml ⁻¹ .h)	127	271	560	1150
t _{max} (h)	1,02	0,79	0,83	0,94
k _{el} (h ⁻¹)	0,26	0,23	0,19	0,18
t _{1/2} (h)	2,62	2,96	3,73	3,84

Médias geométricas são apresentadas para AUC, AUC_t, e C_{max}, médias aritméticas são apresentadas para t_{max}, e k_{el} e média harmônica para o t_{1/2}; n=32 por grupo. C_{max}: concentração plasmática máxima observada; t_{max}: tempo para atingir a concentração plasmática máxima observada; k_{el}: constante de velocidade de eliminação terminal aparente; t_{1/2}: aparente meia-vida terminal; AUC_t: área sob a curva de concentração plasmática-tempo desde o tempo zero ao tempo da última concentração mensurável; AUC: área sob a curva de concentração plasmática-tempo extrapolada ao infinito

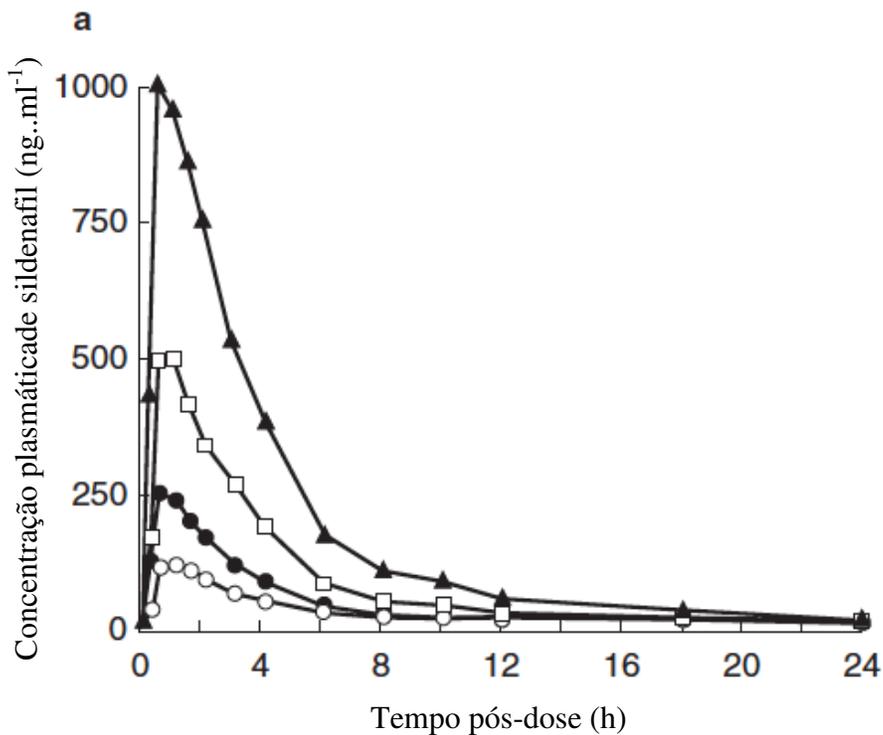


Figura 5. Concentração plasmática de sildenafil oral após doses orais de 25 mg (○), 50 mg (●), 100 mg (□) ou 200 mg (▲); os valores são médias de mínimos quadrados, n = 32 por grupo.

Tabela 3. Efeitos hemodinâmicos de sildenafil endovenoso ao final da infusão (0,67 horas)

Parâmetros	Placebo	Sildenafil endovenoso (n= 8)		
	(n= 8)	20 mg	40 mg	80 mg
PAS (mmHg)	131 ± 12	129 ± 12	124 ± 14*	122 ± 13 [#]
PAD (mmHg)	71 ± 12	68 ± 12	64 ± 12 [#]	64 ± 11 [#]
FC (bpm)	64 ± 10	67 ± 13	64 ± 12	66 ± 14
IRPT	30 ± 5	26 ± 5*	26 ± 4*	25 ± 3 [#]

Valores expressos como média ± DP. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; IRVS: índice de resistência vascular sistêmica. * p <0,01 versus placebo; [#] p<0,01 versus placebo [332].

1.7.2.2 Efeitos Cardiovasculares dos inibidores da PDE5

O sildenafil e outros inibidores seletivos de PDE5 relaxam o músculo liso do corpo cavernoso e têm sido utilizados no tratamento da disfunção erétil [335]. Como um potente e seletivo inibidor específico da guanosina monofosfato, o citrato sildenafil é seguro e eficaz em homens com disfunção erétil de diversas etiologias, incluindo pacientes com doenças cardiovasculares [336]. Também são úteis no tratamento de hipertensão pulmonar por reduzir a reatividade vascular pulmonar [337] e há um potencial benefício em insuficiência cardíaca [306], isquemia cardíaca [323], hipertrofia cardíaca [309], toxicidade por doxorubicina [338], edema pulmonar de elevadas altitudes e hipertensão de elevadas altitudes [339, 340], fenômeno de Raynaud [341] e hipertensão [77, 342].

Estudos demonstram uma melhora da responsividade vascular na disfunção endotelial em pacientes com insuficiência cardíaca [343]. Em pacientes com doença cardíaca isquêmica, o sildenafil reduziu a PA média e pulmonar com leves efeitos na frequência cardíaca e resistência vascular pulmonar e sistêmica sem efeitos no inotropismo cardíaco [344]. Alguns estudos hemodinâmicos sugerem que o sildenafil é um vasodilatador moderado com potencial para aumentar o fluxo e a reserva coronária [345].

O sildenafil também pode atuar por mecanismos secundários independentes da via NO/GMPc [346-348] e/ou através da sinalização intracelular [349]. Isso melhoraria a disfunção endotelial culminando com efeito cardioprotetor em modelos experimentais de isquemia-reperfusão [323]. Além disso, o aumento da síntese de GMPc intracelular contribuiria para a redução da resposta cardíaca simpática [99, 350], levantando-se a hipótese de que a regulação do GMPc cardíaco possa modular alterações nos estímulos β -adrenérgicos [306]. O sildenafil produz relaxamento de segmentos de artérias coronárias epicárdicas isoladas de cães [286] e tende a

aumentar o fluxo sanguíneo miocárdico no exercício e no repouso [351] sem alterar a frequência de pico do fluxo coronariano [352].

O uso de sildenafil em hipertensão também parece resultar em benefícios clínicos. Embora a atuação sobre a resistência vascular sistêmica, em geral, e sobre a via NO-GMPc, em específico, tenha sido extensamente estudada como alvo terapêutico, novos achados sugerem que ainda exista campo para descobertas. Em ratos hipertensos induzidos por L-NAME (um inibidor da sintase de NO) um iPDE5 melhorou a disfunção diastólica do VE e reduziu a RPT comparados com ratos hipertensos não tratados com iPDE5 [113]. Similarmente, sildenafil usado em longo prazo melhorou a função diastólica do VE em pacientes com insuficiência cardíaca sistólica [353].

A inibição da degradação de GMPc aumenta a atividade da NO e proporciona redução de PA em hipertensos [342, 354] e hipertensos resistentes [77]. A PDE5 é expressa em vários sítios incluindo leito vascular sistêmico e miocárdio hipertrofiado [306, 355, 356]. Foi observada uma redução modesta da PA (8/7 mmHg—MAPA de vigília; 5/5 mmHg PA—de consultório) com o uso de sildenafil (por 16 dias) em hipertensos sem tratamento prévio [342]. E em um estudo agudo com pacientes hipertensos resistentes houve uma redução ainda maior da PA (13/10 mmHg) [77]. A função endotelial de hipertensos resistentes também melhorou agudamente (45 min) após uma dose oral inicial de 50 mg e houve uma melhora adicional da vasodilatação mediada por fluxo após uma dose adicional de 50 mg [357].

No entanto, a redução de PA e outros parâmetros hemodinâmicos na população de hipertensos têm respostas variáveis à administração de iPDE5 [354, 358, 359]. Apesar da maioria das evidências serem consistentes com uma redução de PA, ainda é desconhecido por que esse não é um efeito uniforme. É possível que essas ações farmacológicas de inibidores da PDE5

dependam da biodisponibilidade adequada de NO, o qual é sintetizado pelas três isoformas da sintase do NO, incluindo a eNOS.

Justificativa

2 Justificativa

Apesar do conhecimento acumulado em HAR muito ainda não se sabe sobre esta condição patológica. A fisiopatologia é complexa e envolve fatores genéticos, ambientais e suas interações; ainda sobremaneira inexploradas. Além disso, é notável que a resposta farmacológica ao tratamento anti-hipertensivo sofra variações entre indivíduos, mesmo entre pacientes com características clínicas semelhantes.

Sabe-se que a via NO-GMPc tem potentes efeitos vasodilatores e de redução da resistência periférica principalmente agindo sobre artérias musculares. Além disso, o NO possui uma ação aguda sobre o relaxamento de cardiomiócitos potencialmente melhorando a função diastólica do ventrículo esquerdo.

Um estímulo sobre a via NO-GMPc, por meio do uso de inibidores da PDE5, poderia, portanto, resultar em redução da pressão arterial e melhora da função diastólica do ventrículo esquerdo: alvos desejáveis no contexto da HAR. Aparentemente, inibidores da PDE5 tem um maior efeito sobre a pressão arterial de pacientes hipertensos resistentes do que em hipertensos não resistentes. A expressão de PDE5 no sistema arterial periférico é bem documentada. Em miocárdio normal sua expressão é reduzida, no entanto, existe um aumento significativo da PDE5—e um aumento proporcional na inativação de GMPc no cardiomiócito por esta enzima—em situações de hipertrofia ventricular e aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Outrossim, tem sido demonstrado experimentalmente que elevação do GMPc intracelular determinaria ações anti-hipertróficas cardíacas e anti-fibróticas. Assim, existe um potencial efeito benéfico arterial periférico (sobre a RPT e PA) e cardíaco central (sobre a FDVE) pelo uso de iPDE5. A justificativa deste trabalho baseia-se na avaliação desta resposta e na

possibilidade de existir uma modulação dependente da biodisponibilidade de NO (determinada pelo polimorfismo T-786C) desta resposta.

Objetivos

3 Objetivos

- 1) Avaliar os efeitos hemodinâmicos da administração oral aguda do citrato de sildenafil em doses crescentes a pacientes hipertensos resistentes.
- 2) Avaliar os efeitos agudos da administração oral do citrato de sildenafil na função endotelial e função diastólica de pacientes hipertensos resistentes.
- 3) Avaliar se a resposta dos parâmetros hemodinâmicos e parâmetros de função endotelial e diastólica são modulados pelo polimorfismo T-786C da NO sintase endotelial.

Hipótese

4 Hipótese

O citrato de sildenafil oral melhora o perfil hemodinâmico, a função endotelial e a função diastólica do ventrículo esquerdo em pacientes hipertensos resistentes e estes efeitos são modulados pelos genótipos do polimorfismo T-786C da NO sintase endotelial.

Métodos

5 Métodos

O presente estudo foi desenhado como simples cego, controlado por placebo e cruzado de uma via. Foi aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP) (n° 977/2009, 2009/12/15) e realizada de acordo com a Declaração de Helsinki. Termos de Consentimento Livre e Esclarecido foram obtido de todos os pacientes. O estudo está registrado em Clinicaltrials.gov (Protocolo ID: CAAE-0758.0.146.000-0).

5.1 Casuística

Pacientes com hipertensão de difícil controle provenientes do Sistema de Único de Saúde foram submetidos à triagem durante seis meses para identificação de hipertensão secundária ou pseudo hipertensão resistente (causas identificáveis e potencialmente removíveis de hipertensão, incluindo síndrome de Conn, Cushing, estenose de artéria renal, feocromocitoma, coarctação da aorta e hipertensão do jaleco branco) e avaliação da aderência ao tratamento antes de serem considerados hipertensos resistentes (pacientes com contagem de medicamentos tomados >80% eram considerados aderentes [360]). Foram obtidos a história clínica, exame físico, eletrocardiograma (ECG) de 12 derivações, MAPA de 24 horas (Spacelabs 90217, Spacelabs Inc, WA, USA [361]), ecocardiograma e amostras de sangue para exames de rotina ambulatorial e específicos de todos os pacientes. Para exclusão do diagnóstico de isquemia miocárdica foram realizados cintilografia miocárdica (SESTAMIBI) ou ecocardiografia de estresse em todos os indivíduos incluídos no estudo. Os pacientes elegíveis para o estudo foram submetidos à genotipagem para o polimorfismo T-786C, identificados como portadores dos alelos T e / ou C e divididos em subgrupos (TT; TC e CC).

Os critérios de inclusão foram: sexo masculino ou feminino com mais de 35 anos de idade e diagnóstico de hipertensão resistente, de acordo com os critérios da *American Heart*

Association [13] e com diagnóstico de disfunção diastólica (estágios I e II) detectado por ecocardiograma.

Os critérios de exclusão foram história de doença cardíaca isquêmica, doença cardíaca valvar grave, insuficiência cardíaca, arritmias graves (incluindo fibrilação atrial), disfunção renal grave (clearance de creatinina < 30 ml/min), doença arterial periférica grave, história prévia de doença cerebrovascular, doenças respiratórias, neurológicas, ou hepáticas graves, doença inflamatória sistêmica ou vigência de tratamento de neoplasia maligna. Também foram excluídos pacientes em uso crônico de doadores de óxido nítrico (nitratos), devido ao risco de interação medicamentosa com o sildenafil, e pacientes com contraindicação ao uso de sildenafil.

Estimou-se um tamanho de amostra de 20 pacientes RHTN, para detectar uma diferença na PAM de 10 mmHg (desvio padrão de 15 mmHg)—após administração de sildenafil—com poder de 80% e erro alfa de 0,05. Sessenta e três pacientes hipertensos resistentes foram selecionados e 26 deles foram incluídos no estudo (9 TT, 9, CT e CC 8, de acordo com o T-786 C genótipo eNOS).

5.2 Genotipagem

O sangue foi coletado em tubos contendo sangue total e EDTA, após um período de 8 horas de jejum. Em seguida, foi realizada a extração do DNA genômico (kit QIAamp DNA Blood Mini Kit - Qiagen, Hilden, Alemanha) e o genótipo determinado por reação em cadeia da polimerase (PCR) (TaqMan Allele Discrimination assay - Applied Biosystems, Foster City, CA). A fluorescência da amplificação pela PCR foi detectada usando-se o Chromo Detector 4 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) e analisada com o software do fabricante.

5.3 Nitrito e GMP cíclico

Amostras de sangue foram coletadas no início e final do protocolo sildenafil para avaliação de nitrito plasma e os níveis de cGMP. Para as medidas de nitrito, plasma heparinizado foi coletado e imediatamente adicionado à uma solução de preservação de nitrito numa diluição 5:1 contendo 0,8 M de ferricianeto e 1% de NP-40 [27]. As amostras foram desproteinizadas com metanol (1:1) e centrifugadas a 14.000 g durante cinco minutos. Em seguida, 300 ul de sobrenadante foram injetados na solução triiodeto acidificado e purgado com nitrogênio com quimioluminescência em fase gasosa por um analisador de NO (Sievers Modelo 280i NO Analyzer, Boulder, Colorado, EUA). O GMPc foram adicionados a tubos de plasma EDTA e analisadas por ensaio imunoenzimático (KGE003, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

5.4 Vasodilatação Mediada pelo Fluxo (VMF)

A função endotelial foi estimada pelo método de vasodilatação mediada pelo fluxo por meio de ultra-sonografia com transdutor vascular (4-13 MHz, Siemens Acuson CV70, Munich, Germany), sincronizada com ECG, antes e após a administração de sildenafil conforme diretrizes previamente publicadas [163]. Com os pacientes em posição supina, a artéria braquial era explorada longitudinalmente 5-10 cm acima da fossa antecubital e uma medida basal dos diâmetros era obtida sempre no mesmo instante do ciclo cardíaco (ao pico da onda T). Um manguito de poliuretano (Hokanson, Inc., Bellevue, WA, USA), previamente posicionado em torno do antebraço, era insuflado a uma pressão de 250 mmHg por um período de 5 minutos e, em seguida, rapidamente esvaziado. Entre 45 a 120 segundos após, os diâmetros da artéria braquial eram então reavaliados no mesmo instante do ciclo cardíaco (pico da onda T). O VMF foi expresso como a variação relativa (%) do diâmetro do vaso após a compressão em relação ao

seu valor basal. A vasodilatação independente do endotélio não foi avaliada devido à possível interação entre doadores de NO e sildenafil. Os coeficientes de variação para medidas repetidas de diâmetro da artéria interobservador e intra-observador foram de 1,9% e 1,6%, respectivamente.

5.5 Avaliação Hemodinâmica Contínua

Os dados hemodinâmicos foram registrados batimento a batimento de forma não invasiva pelo aparelho Finometer (Modelo Finometer® MIDI, Finapres Medical Systems, Amsterdam, Holanda). Um manguito de tamanho adequado era colocado na falange média do terceiro ou quarto dedo da mão esquerda e o braço permanecia em repouso sobre o leito durante todo o protocolo. Foram obtidos destes registros o débito cardíaco (DC – l/min), frequência cardíaca (FC - bpm), PA média (PAM - mmHg) e da resistência periférica total (RPT - dyn.s/cm⁻⁵) durante todo o protocolo. Os valores utilizados correspondem aos obtidos nos últimos 10 minutos de cada intervalo de 30 minutos (500 medidas para cada período).

Este dispositivo baseia-se nos métodos *volume-clamp* e *modelflow* utilizando a fotopletiografia com infravermelho durante a semicompressão contínua das artérias digitais por um manguito externo. O diâmetro de uma artéria é mantido constante (“clampeado”) a um determinado diâmetro sob o manguito enrolado em torno do dedo (Peñaz, 1973). Assim, estabelece-se um valor basal, apesar das alterações na pressão arterial no decurso de cada batimento cardíaco, e as alterações do diâmetro são detectadas por meio de um fotopletiógrafo infravermelho imbutido no manguito. Um sistema de um ajuste dinâmico (Physiocal, Finometer Medical Systems, Amsterdam) é utilizado para definir e manter o diâmetro da artéria digital.

Os registros de cada onda de pulso são armazenados no software BeatScope. O programa Beatscope captura a onda de pulso (sua integral) e procura automaticamente em um arquivo de amostras a que mais se assemelha com cada batimento isolado. Uma vez que o pulso inicial é detectado, parâmetros adicionais são derivados. O método Modelflow [362] tal como implementado no Finometer calcula uma forma de onda do fluxo aórtico, a partir da onda de pulso digital, simulando um modelo não linear de três elementos (impedância aórtica, complacência arterial e resistência periférica). Integrando a onda de fluxo aórtico por batida o aparelho fornece o volume sistólico (VS) ventricular esquerdo e, conseqüentemente, o DC multiplicando SV pela FC instantânea. A pressão arterial média é computada como a integral da curva de pressão durante um ciclo cardíaco completo (Sístole + Diástole) e, indiretamente, a RPT [363].

As medidas da pressão arterial digital são altamente comparáveis às medidas de pressão intra-arterial (artéria braquial). O aparelho controla as alterações de VS e fornece valores de PA semelhantes aos obtidos simultaneamente por cateter intra-arterial [364-366]. A melhor acurácia do aparelho está relacionada à detecção da variação dos valores hemodinâmicos [367].

5.6 Ecocardiografia

Os parâmetros de avaliação da função diastólica foram obtidos conforme recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (ASE) [117] antes e após a administração do sildenafil (transdutor setorial multi-freqüência de 2-4MHz, Siemens Acuson CV70, Munique, Alemanha). Usando o modo M direcionado por imagem bidimensional obteve-se os diâmetros diastólico do VE (DDVE) e sistólico do VE (DSVE), do septo interventricular (SIV) e parede posterior do VE (PPVE). Os parâmetros DDVE, SIV e PPVE foram avaliados ao final da diástole e o DSVE no menor diâmetro da sístole. Todas as medidas foram sincronizadas com

monitorização eletrocardiográfica. A massa do VE foi calculada pela fórmula recomendada pela ASE [368]. O índice de massa ventricular esquerda (IMVE) foi calculado dividindo-se a massa de VE pela superfície corpórea, e a espessura relativa da parede (ERP) foi obtida multiplicando a PPVE por dois e dividindo pelo DDVE. Os parâmetros obtidos por Doppler foram: velocidades de enchimento rápido do fluxo mitral (onda E) e sístole atrial (onda A); relação E/A; tempo de desaceleração da onda E (TDE); tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) do ventrículo esquerdo; Doppler tecidual da porção lateral e septal do anel mitral (E' e A'); relação E / e' septal e lateral; volume atrial esquerdo indexado (à superfície corpórea). O volume atrial esquerdo foi calculado pelo método de Simpson [368] em dois planos diferentes (incidência apical de 4 câmaras e incidência apical de 2 câmaras) ao final da sístole ventricular (pico da onda T).

Disfunção diastólica leve (grau I) foi caracterizada como relação E/A mitral $<0,8$; TDE >200 ms; TRIV >100 ms; e' septal <8 cm, ou e' lateral <10 cm; e a relação $E/e' <8$ (septal e lateral). Disfunção diastólica moderada (grau II) foi considerada como relação E/A mitral entre 0,8 a 1,5, (pseudonormal); e' septal <8 cm/s ou e' lateral <10 cm/s (lateral); e relação E/e' entre 9 e 12. E disfunção diastólica grave ocorreu quando a relação E / A mitral foi $>1,5$; TDE <140 ms; TRIV >100 ms; e relação E/e' septal <8 cm ou relação E/e' lateral <10 cm/s. Os parâmetros ecocardiográficos foram avaliados por um segundo especialista cego para aos dados clínicos do paciente. Os coeficientes de variação intra e interobservador foram de 5,5% e 9,5%, respectivamente.

5.7 Protocolo do Estudo

Após um período de oito horas de jejum, os pacientes tomaram a medicação usual e compareceram ao laboratório às 8 horas da manhã para o início do protocolo. Inicialmente, foi verificada a PA (PAS e PAD) no braço direito por um profissional treinado, com o paciente sentado e utilizando-se um esfigmomanômetro validado (HEM-907XL, OMRON Healthcare Inc, IL, USA). A temperatura na sala foi mantida entre 22-24 ° C. Amostras de sangue (para posterior dosagem de GMPc e metabólitos de NO) foram coletadas no início e ao final do protocolo. VMF e avaliação ecocardiográfica foram realizadas antes e após as medidas hemodinâmicas (Finometer). Os indivíduos permaneceram em decúbito dorsal durante todo o protocolo. Trinta minutos de registro das variáveis hemodinâmicas (período basal) precederam a dose inicial de sildenafil. Sem interromper os registros dos parâmetros hemodinâmicos, doses progressivas de sildenafil (37,5 mg, 50 mg e 100 mg, nesta ordem) foram então administradas a intervalos de trinta minutos e seguidas de gravação contínua de 30 minutos após a última dose (Figura 6). Ao final do protocolo, os pacientes permaneceram por 1 hora em observação antes da alta. O protocolo durava cerca de quatro horas por paciente. No protocolo placebo, os procedimentos foram repetidos nos mesmos moldes exceto pela administração dos comprimidos de placebo. Estes medicamentos foram obtidos em farmácia de manipulação e portanto não eram idênticos aos comprimidos de sildenafil. Para simular o protocolo sildenafil, foram administrados um número crescente dos comprimidos de placebo (1 comprimido; 2 comprimidos; 3 comprimidos) separados por intervalos de 30 minutos. Cada paciente foi avaliado duas vezes em um desenho cruzado (“*cross-over*”) em intervalos de pelo menos duas semanas entre os protocolos do sildenafil e placebo.

Protocolo

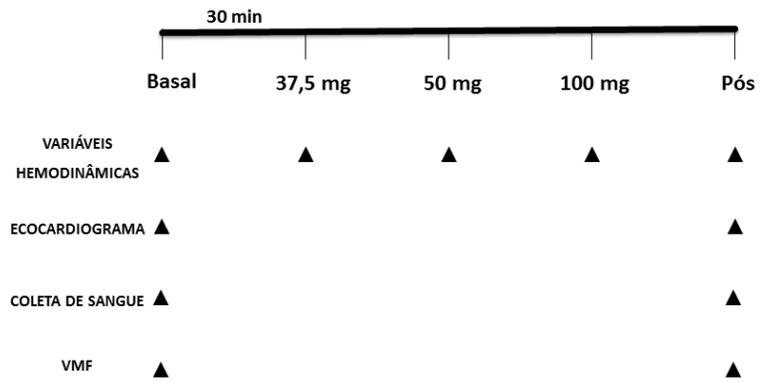


Figura 6 – Protocolo do estudo. VMF: Vasodilatação mediada pelo fluxo.

5.8 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados sob a forma de média (\bar{x}) e erro padrão da média (EPM). A distribuição de normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste qui-quadrado foi aplicado para análise estatística das variáveis categóricas e o teste ANOVA de uma via, para distribuições paramétricas, ou Kruskal-Wallis, para distribuições não paramétricas, foram utilizados para avaliar as variáveis quantitativas. Para a análise dos parâmetros hemodinâmicos intra-grupos aplicou-se o teste de Friedman ou ANOVA de duas vias para medidas repetidas conforme a distribuição da amostra. O teste t pareado foi usado para analisar os dados ecocardiográficos e de VMF e para a diferença entre os dados obtidos ao início e ao final do protocolo. O nível de significância estatística aceito foi menor que 0,05. Um teste de tendência foi também aplicado especificamente para a análise dos efeitos do polimorfismo T-786 C sobre a PAM e RPT. A análise estatística foi obtida utilizando-se o programa Prisma for Windows, versão 5.00. GraphPad Software, Inc, 1992-2007, CA, USA. O nível de significância aceito foi de 0,05.

Resultados

6 Resultados

6.1 Casuística

Na triagem inicial foram avaliados 120 pacientes com diagnóstico de hipertensão de difícil controle. A distribuição dos genótipos no grupo de hipertensos (TT: 46% TC: 41%; CC: 13%) permaneceu preservada em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). Destes pacientes avaliados, 63 foram considerados portadores de HAR após ajuste de medicação, avaliação de aderência ao tratamento, além de exclusão de pseudorresistência e causas secundárias de hipertensão; 37 concordaram em participar do estudo; e, destes, 11 foram excluídos por apresentarem critérios de exclusão (1 por cardiopatia isquêmica, 5 eram tabagistas ativos, 2 por doença arterial periférica, 2 por acidente vascular cerebral prévio, 1 por insuficiência cardíaca). Vinte e seis pacientes foram, portanto, incluídos no estudo, dos quais, 9 eram portadores do genótipo TT, 9 do genótipo TC e 8 do genótipo CC.

As características gerais dos pacientes estão listadas na tabela 4 e os parâmetros bioquímicos são apresentados na tabela 5. Não foram observadas diferenças entre os genótipos (TT vs TC vs CC) em relação à gênero, idade, índice de massa corpórea, PA de consultório, MAPA, índice de massa do VE, espessura relativa de parede do VE; bem como, não houve diferença estatística entre os parâmetros bioquímicos observados em cada grupo genotípico.

Tabela 4. Características gerais dos pacientes estudados

	Todos	TT	TC	CC	p
	(n=26)	(n= 9)	(n= 9)	(n= 8)	
Gênero (F/M)	16/10	5/4	6/3	5/3	0,887
Idade (anos)	57 ± 8,2	55 ± 5,8	61 ± 9,3	56 ± 8,7	0,262
IMC (kg/m ²)	32 ± 5,4	32,0 ± 5,4	30,9 ± 5,4	33,2 ± 5,8	0,710
PAS consultório (mmHg)	137 ± 22,1	140,4 ± 16,7	132,6 ± 14,0	140,0 ± 33,1	0,739
PAD consultório (mmHg)	80 ± 9,4	77,8 ± 10,1	78,3 ± 6,0	83,7 ± 11,7	0,402
PAS-MAPA (mmHg)	131,2 ± 18,3	137,3 ± 20,6	122,0 ± 7,2	134,8 ± 21,8	0,184
PAD-MAPA (mmHg)	78,0 ± 13,7	78,5 ± 12,0	72,4 ± 10,0	83,6 ± 17,7	0,251
IMVE (g/m ²)	95,0 ± 21,4	108,4 ± 17,2	90,1 ± 15,9	85,9 ± 25,6	0,060
ERP	0,390 ± 0,04	0,390 ± 0,04	0,393 ± 0,04	0,391 ± 0,04	0,988
Quest. Berlim (alto risco)	20 (76%)	8 (88%)	7 (78%)	5 (62%)	0,4345

O gênero está representado como número absoluto de indivíduos. Os demais parâmetros são expressos como média ± desvio padrão. F: feminino, M: masculino, IMC: índice de massa corporal; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; MAPA: monitorização ambulatorial da pressão arterial; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo; ERP: espessura relativa da parede; Quest. Berlim: questionário de Berlim. Características genotípicas dos grupos (TT, CT e CC) foram comparados por análise de variância.

Os pacientes receberam uma média de 4,4 anti-hipertensivos ao dia. Os medicamentos mais usados foram diuréticos (100%), inibidores da enzima de conversora da angiotensina (31%), bloqueadores do receptor da angiotensina (69%), antagonistas de canais de cálcio (81%), diuréticos poupadores de potássio (50%) e simpatolíticos de ação central (42%). Não houve diferença estatística em relação ao número e classes de anti-hipertensivos entre os grupos genotípicos ($p > 0,05$) (tabela 6).

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos dos pacientes estudados

	Todos (n=26)	TT (n= 9)	TC (n= 9)	CC (n= 8)	p
Glicose (mg.dL ⁻¹)	129,0 ± 55,2	131,2 ± 40,8	130,5 ± 80,1	125,0 ± 40,4	0,971
HbA1C (%)	7,1 ± 1,9	7,5 ± 1,8	7,0 ± 2,2	6,9 ± 1,9	0,842
Colesterol (mg.dL ⁻¹)	195,0 ± 38	181,4 ± 41,5	207,1 ± 44,1	197,1 ± 23,1	0,367
HDL-c (mg.dL ⁻¹)	43,0 ± 10,2	43,7 ± 12,3	41,2 ± 8,5	44,2 ± 10,6	0,815
LDL-c (mg.dL ⁻¹)	118,0 ± 10,2	104,5 ± 28,6	128,4 ± 37,0	124,1 ± 30,5	0,272
TG (mg.dL ⁻¹)	166,0 ± 78,3	165,7 ± 89,0	187,5 ± 81,6	144,0 ± 63,8	0,538
Clearance de Creatinina (ml por min por 1.73m ²)	93,0 ± 25	91,5 ± 23,7	88,8 ± 26,3	101,6 ± 27,7	0,579
Microalbuminuria (mg.g ⁻¹)	87,8 ± 173,1	102,6 ± 177,4	92,8 ± 171,5	68,0 ± 169,3	0,833
Sódio urinário (mEq.L ⁻¹)	263,0 ± 101,0	299,5 ± 48,5	225,5 ± 74,8	271,3 ± 150,3	0,292
ARP (ng.mL ⁻¹ por h)	11,0 ± 13,0	13,2 ± 17,4	10,4 ± 12,5	9,5 ± 8,4	0,840
CPA (ng.dL ⁻¹)	14,0 ± 10,0	12,9 ± 11,9	12,5 ± 11,0	17,1 ± 8,7	0,637
ARR (ng.dL ⁻¹ per ng.mL ⁻¹ per h)	2,3 ± 2,2	1,7 ± 1,4	2,3 ± 2,7	3,0 ± 2,5	0,541

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. HDL-c: colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol de lipoproteína de baixa densidade; TG= triglicérides; PRA: atividade da renina plasmática; CPA: concentração plasmática de aldosterona; ARR.: relação aldosterona-renina; HbA1C: hemoglobina A1c. . Características genotípicas dos grupos (TT, CT e CC) foram comparados por análise de variância.

Tabela 6. Distribuição dos anti-hipertensivos (anti-HTN) e inibidores da HMG-CoA redutase

	TT	TC	CC	p
	(n= 9)	(n= 9)	(n= 8)	
Total de anti-HTN	4.7 ± 0.8	4.3 ± 1.0	4.2 ± 1.2	0.534
Diuréticos	100% (9)	100% (9)	100% (8)	-
Antagonistas de aldosterona	44.4% (4)	44.4% (4)	62.5% (5)	0.333
Beta-bloqueadores	66.6% (6)	66.6% (6)	62.5% (5)	0.979
IECA	44.4% (4)	33.3% (3)	12.5% (1)	0.355
ARA II	66.6% (6)	66.6% (6)	75% (6)	0.913
BCC	88.8% (8)	77.7% (7)	75% (6)	0.738
Simpatolíticos de Ação central	55.5% (5)	33.3% (3)	37.5% (3)	0.600
Inibidores HMG-Coa redutase	66% (6)	11% (1)	25% (2)	0.037

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (Total de anti-HTN) porcentagem e número absoluto de uso. IECA= inibidor da enzima conversora da angiotensina; ARA II= antagonista do receptor da angiotensina II; BCC= bloqueador de canal de cálcio. Características genotípicas dos grupos (TT, CT e CC) foram comparados por teste qui-quadrado.

6.2 Nitrito e GMPc Plasmáticos

6.2.1 Hipertensos Resistentes

Considerando todos os pacientes (n=26), os níveis plasmáticos de nitrito (93.8 ± 8.2 vs. 106.6 ± 8.9 nM/l; pré e pós-sildenafil, figura 7A) e GMPc (141.9 ± 15.5 vs. 134.4 ± 10.8 pmol/mL; pré e pós-sildenafil, figura 7B) não se alteraram após a administração de sildenafil quando comparados com os níveis basais.

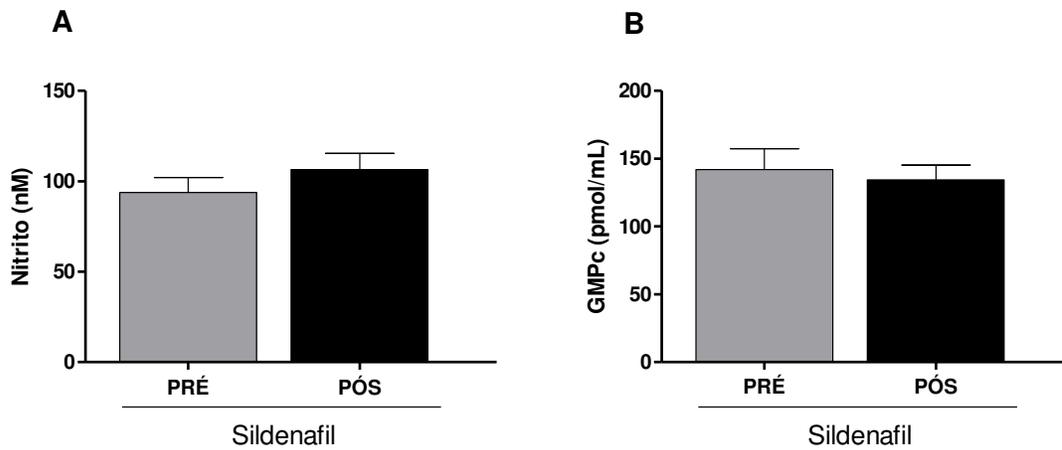


Figura 7. Níveis plasmáticos de nitrito e GMPc, antes (pré) e após (pós) a administração do sildenafil no grupo total de pacientes (n=26). A) níveis de nitrito B) níveis de GMPc, antes e após o tratamento com sildenafil. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

6.2.2 Genótipos da eNOS (TT Versus TC Versus CC)

Entre os grupos genotípicos, os valores de nitrito e GMPc plasmáticos também não foram considerados diferentes ($p < 0.05$) (figura 8). Interessantemente, houve um aumento dos níveis de nitrito em todos os grupos (apesar de não ter havido valor estatístico) após as doses cumulativas de sildenafil.

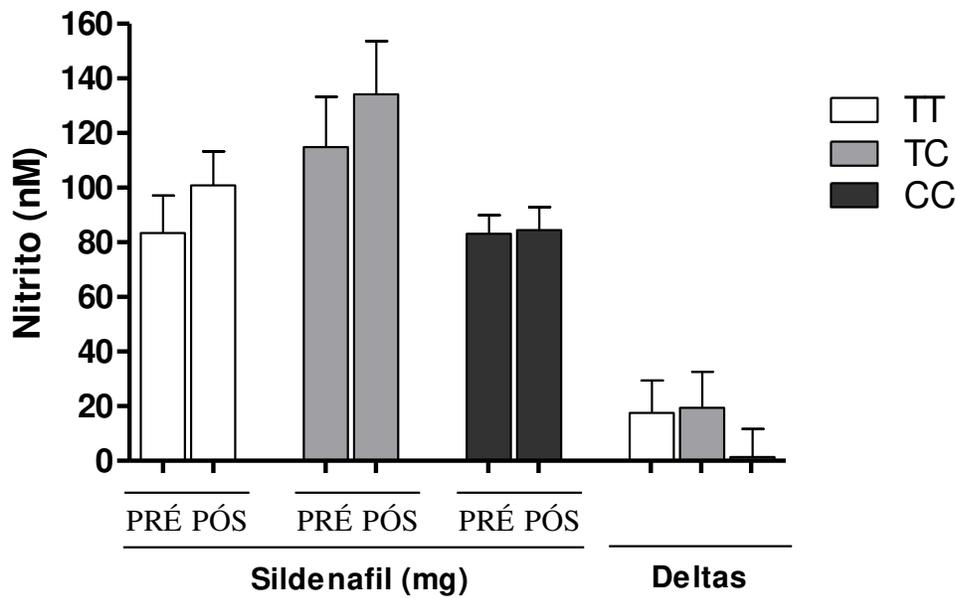


Figura 8. Níveis plasmáticos de nitrito nos grupos genotípicos, antes (pré) e após (pós) a administração do sildenafil.. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

6.3 Vasodilatação Mediada Pelo Fluxo (VMF)

6.3.1 Hipertensos Resistentes

Considerando todos os pacientes (n= 26), as mudanças observada nos valores de VMF não atingiram diferença estatística após a administração aguda do sildenafil ($6,8 \pm 0,5$ para $7,8 \pm 0,5\%$; pré e pós sildenafil) (Figura 9). Assim como, não houve diferença entre os valores obtidos antes e após as doses de placebo ($6,1 \pm 0,5$ para $6,5 \pm 0,6\%$; pré e pós-placebo) (figura 9).

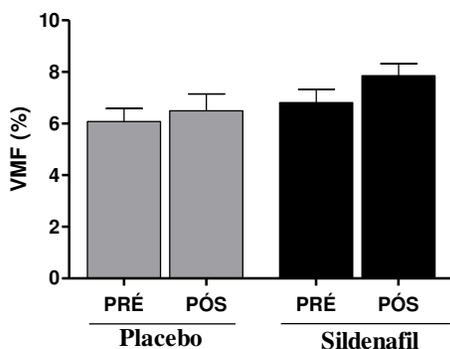


Figura 9. Vasodilatação mediada por fluxo (VMF), antes (pré) e após (pós) a administração do sildenafil no grupo total de pacientes (n=26). Os valores estão expressos como média \pm EPM.

6.3.2 Genótipos da eNOS (TT Versus TC Versus CC)

Também não houve diferença de VMF, antes ou após o sildenafil ou o placebo, entre os grupos genotípicos ($p > 0,05$) (Figura 10 e tabela 7).

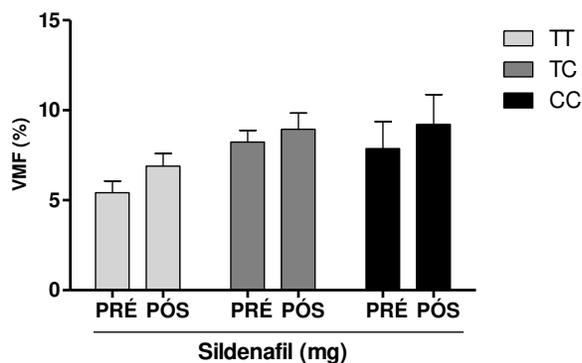


Figura 10. Vasodilatação mediada por fluxo (VMF) nos grupos genotípicos, antes (pré) e após (pós) a administração do sildenafil. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

6.4 Efeitos Hemodinâmicos

6.4.1 Hipertensos Resistentes

Durante todo o protocolo, o tratamento com sildenafil nas doses de 37,5 mg, 50 mg e 100 mg reduziu os valores absolutos da PAM comparados aos valores basais e aos valores das doses correspondentes de placebo (Figura 11). Os deltas da redução da PAM no grupo total também foram maiores no protocolo sildenafil em comparação ao protocolo placebo (figura 12). Ressalte-se que a diminuição mais acentuada da PAM foi observada após a dose mais baixa do sildenafil (37,5 mg) e, apesar da redução ter sido mantida, nenhum decréscimo adicional na PAM foi observada com as doses crescentes até o final do protocolo.

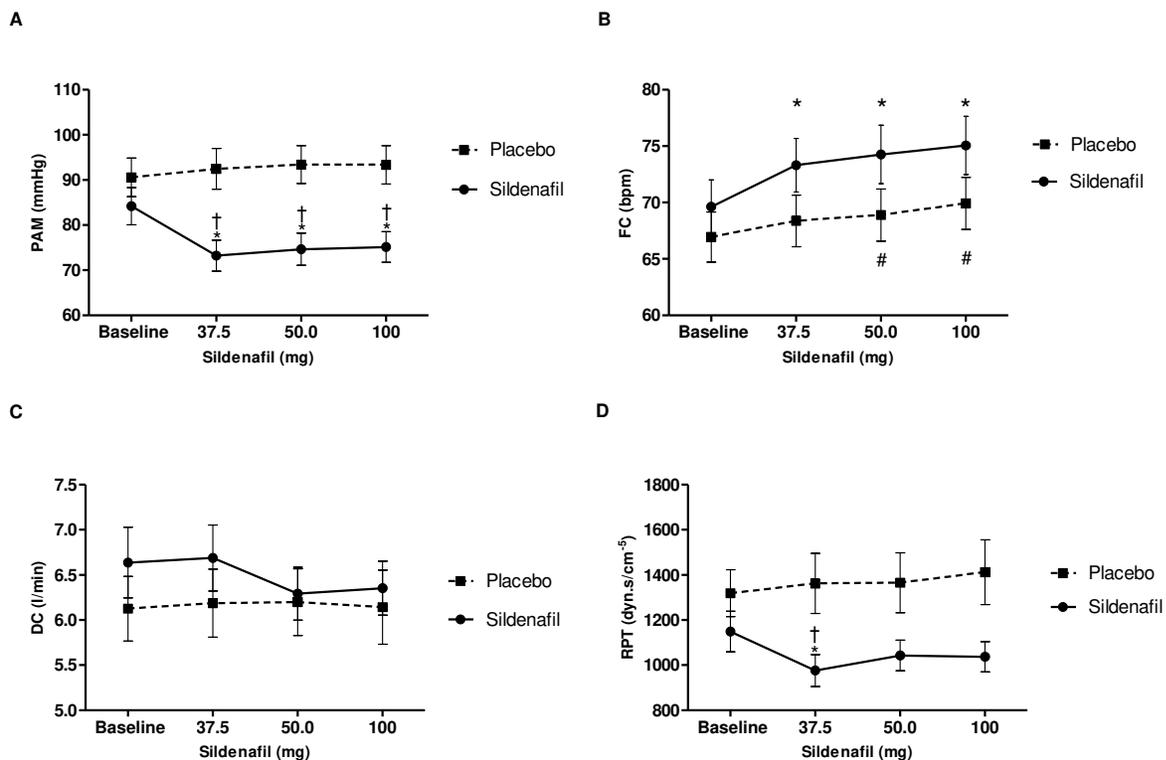


Figura 11. Parâmetros hemodinâmicos no tempo basal e após as doses crescentes de sildenafil (37,5, 50 e 100 mg) e placebo. A) Pressão arterial média (PAM); B) Frequência cardíaca (FC); C) Débito cardíaco (DC); D) Resistência periférica total (RPT). Os valores estão expressos como média \pm EPM. Teste de Friedman (para avaliação intra-grupo) e Kruskal-Wallis (para avaliação entre-grupos) seguidos pelo teste de comparação múltipla de Dunn. * $p < 0.05$ sildenafil (dose) versus basal; # $p < 0.05$ placebo (dose) versus basal, † sildenafil (dose) versus placebo (dose correspondente).

A RPT também diminuiu significativamente após a primeira dose de sildenafil (37,5 mg) em comparação com os valores basais e com a dose correspondente de placebo (Figura 11). No entanto, a redução dos níveis absolutos de RPT ocorrida após as doses 50 mg e 100 mg de sildenafil não foi considerada estatisticamente diferente que a RPT basal. Porém, as quedas refletidas nos deltas da RPT, correspondentes a primeira e última dose (37,5 mg, 100 mg), foram, também, maiores no protocolo sildenafil do que no placebo (figura 12).

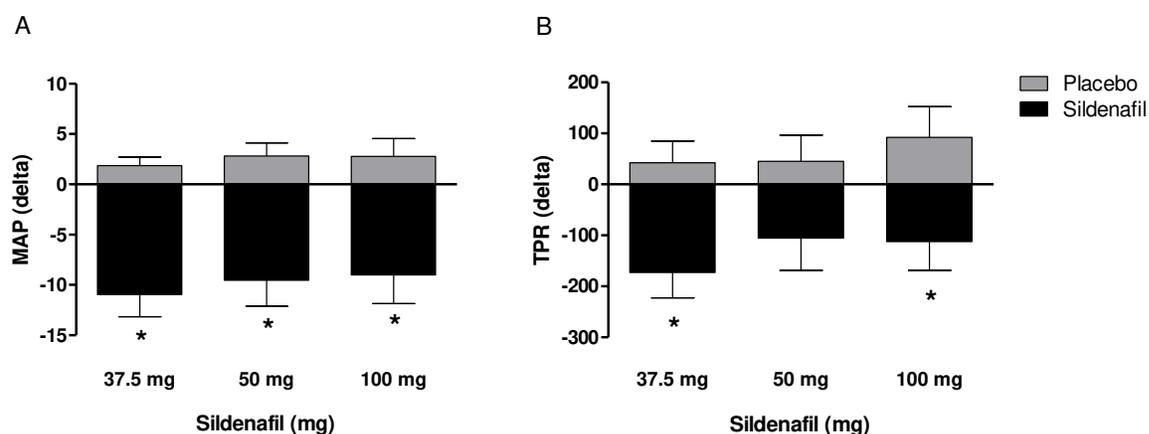


Figura 12 – Deltas dos valores absolutos em relação ao basal após cada uma das doses cumulativas (sildenafil e placebo). A) pressão arterial média (PAM), B) resistência periférica total (RPT). Os valores foram expressos como média \pm EPM. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *p < 0,05: sildenafil versus placebo (dose correspondente).

O débito cardíaco permaneceu inalterado apesar das crescentes doses de sildenafil. A FC aumentou progressivamente com as doses cumulativas de sildenafil. Curiosamente, a FC também aumentou durante o protocolo placebo, em comparação com os valores basais. Quanto às demais variáveis hemodinâmicas (MAP, DC e RPT) durante o protocolo placebo, não houve qualquer efeito considerado significativo (figura 11).

6.4.2 Genótipos da eNOS (TT Versus TC Versus CC)

Comparando-se os grupos genotípicos, o grupo CC foi o único grupo no qual observou-se diminuição de RPT inicialmente (em resposta ao sildenafil), mas que não se manteve até ao final do protocolo. Neste grupo, a RPT retornou aos níveis basais (basal: $1263,7 \pm 568,5 \text{ dyn.s/cm}^{-5}$; 100 mg: $1263,1 \pm 513,9 \text{ dyn.s/cm}^{-5}$) após todas as doses acumuladas de sildenafil (tabela 7) ($p < 0.05$). Comparados ao grupo TT, os pacientes CC apresentaram uma diferença significativa dos valores absolutos de RPT ao final do protocolo (figura 13). O teste de tendência Jonckheere-Terpstra também mostrou diferenças na resistência periférica total (RPT) após as doses de 37,5 mg, 50 mg e 100 mg de sildenafil, mas não na pressão arterial média (MAP) (dados não apresentados). Em conformidade com isso, os valores basais absolutos de RPT do grupo TT foram significativamente mais baixos do que os valores correspondentes do grupo de TC (também portador do alelo C). Apesar dos níveis absolutos de RPT correspondentes a todas as doses terem sido sempre menores no grupo TT (em ambos os protocolos, sildenafil e placebo) essas diferenças não alcançaram significância estatística (tabela 7 e figura 13; os dados da tabela 7 correspondem ao gráfico da figura 13).

Tabela 7. Parâmetros hemodinâmicos durante a administração das doses de sildenafil por genótipos

		PAS	PAD	PAM	FC	VS	DC	RPT
		(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(bpm)	(ml)	(l/min)	(dyn.s/cm ⁵)
BASAL	CC	139,4 ± 36,5	71,4 ± 23,7	93,8 ± 27,0	74,2 ± 14,9	88,2 ± 19,9	6,4 ± 1,6	1263,7 ± 568,5
	TC	124,2 ± 22,2	62,3 ± 14,4	82,8 ± 17,0	65,4 ± 13,4	86,0 ± 23,2	5,6 ± 1,8	1318,1 ± 502,6
	TT	121,4 ± 25,9	55,5 ± 14,3	76,9 ± 17,8	69,7 ± 13,5	112,1 ± 22,5	7,8 ± 2,3	878,3 ± 404,6
37,5 (mg)	CC	121,1 ± 31,0	62,5 ± 21,0	81,1 ± 23,6	76,6 ± 15,3	88,3 ± 23,0	6,6 ± 1,7	1048,6 ± 567,6
	TC	105,2 ± 18,9	55,2 ± 13,3	71,8 ± 14,5	68,3 ± 11,4	82,8 ± 19,6	5,6 ± 1,7	1117,9 ± 460,6
	TT	104,2 ± 21,2	49,4 ± 12,1	67,4 ± 14,0	75,3 ± 16,9	103,4 ± 21,5	7,7 ± 2,3	770,4 ± 370,4
50 (mg)	CC	126,6 ± 30,9	66,2 ± 17,8	85,4 ± 20,9	76,8 ± 15,2	81,1 ± 16,4	6,1 ± 1,4	1174,7 ± 426,4
	TC	105,3 ± 24,1	56,1 ± 15,0	72,4 ± 16,8	69,1 ± 15,1	79,2 ± 20,2	5,4 ± 1,5	1153,5 ± 409,2
	TT	104,2 ± 21,2	50,2 ± 11,8	67,2 ± 13,8	77,1 ± 17,1	95,9 ± 13,8	7,3 ± 1,8	797,2 ± 371,4
100 (mg)	CC	129,7 ± 33,9	68,1 ± 17,1	87,7 ± 21,0	77,4 ± 15,9	76,4 ± 12,2	5,8 ± 1,4	1263,1 ± 513,9
	TC	103,7 ± 18,9	54,0 ± 10,8	70,1 ± 12,3	69,8 ± 15,0	81,8 ± 25,3	5,5 ± 1,7	1086,9 ± 374,7
	TT	107,4 ± 19,5	51,4 ± 11,5	68,9 ± 13,3	77,8 ± 16,7	97,3 ± 14,3	7,5 ± 1,6	783,1 ± 325,4

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; VS: volume sistólico; DC: débito cardíaco; RPT: resistência periférica total. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Outro achado interessante, porém curioso, é que os valores de DC obtidos dos pacientes nos protocolos sildenafil e placebo foram sempre maiores no grupo TT do que nos grupos portadores do alelo C. Essas diferenças foram consideradas consistentemente significativas ($p < 0.05$) durante todo o protocolo placebo (figura 14 C). No entanto, durante o protocolo sildenafil, apesar do DC ter se mantido maior no grupo TT, este efeito não foi significativo pela análise estatística (figura 13 C). Além disso, durante o protocolo placebo, os pacientes do grupo CC apresentaram os maiores níveis de PAM (basal, e após as doses subsequentes) e RPT (doses de placebo) (figura 14 A e 14 D).

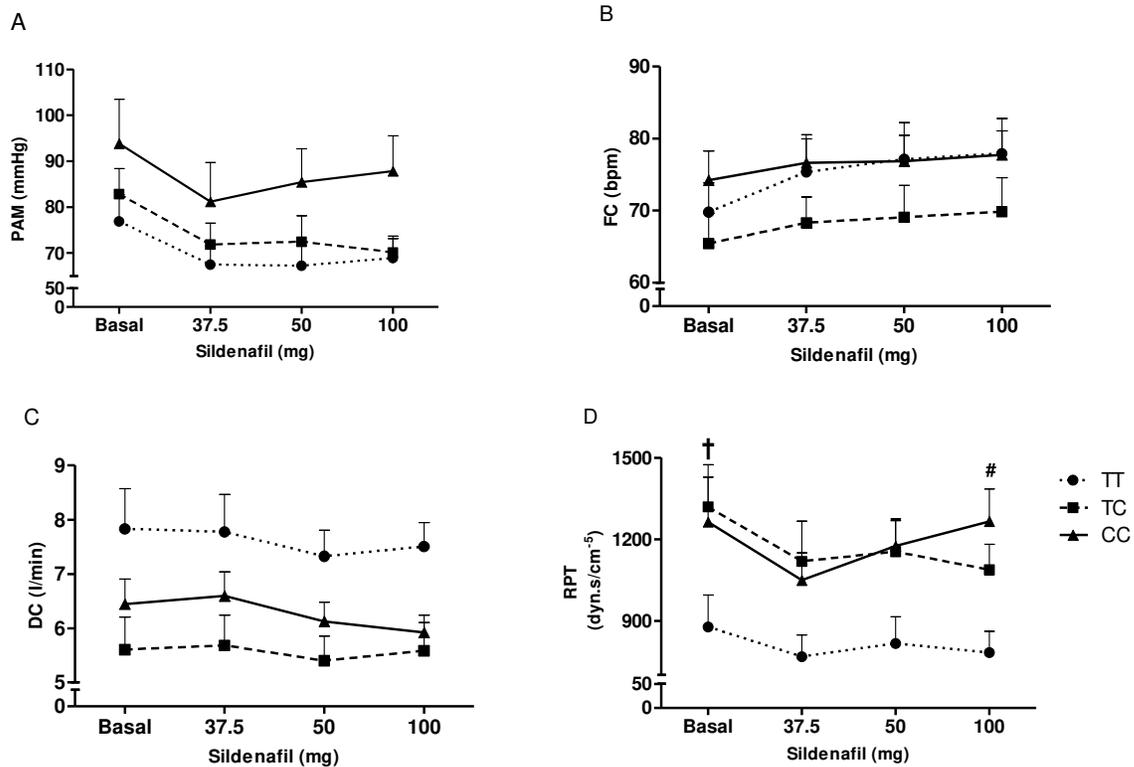


Figura 13. Parâmetros hemodinâmicos no tempo basal e após as doses crescentes de sildenafil (37,5, 50 e 100 mg) de sildenafil de acordo com o genótipo. A) pressão arterial média (PAM), B) frequência cardíaca (FC), C) débito cardíaco, D) resistência periférica total (RPT). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. † $p < 0,05$ TT versus TC (basal), # $p < 0,05$ TT versus CC (dose correspondente).

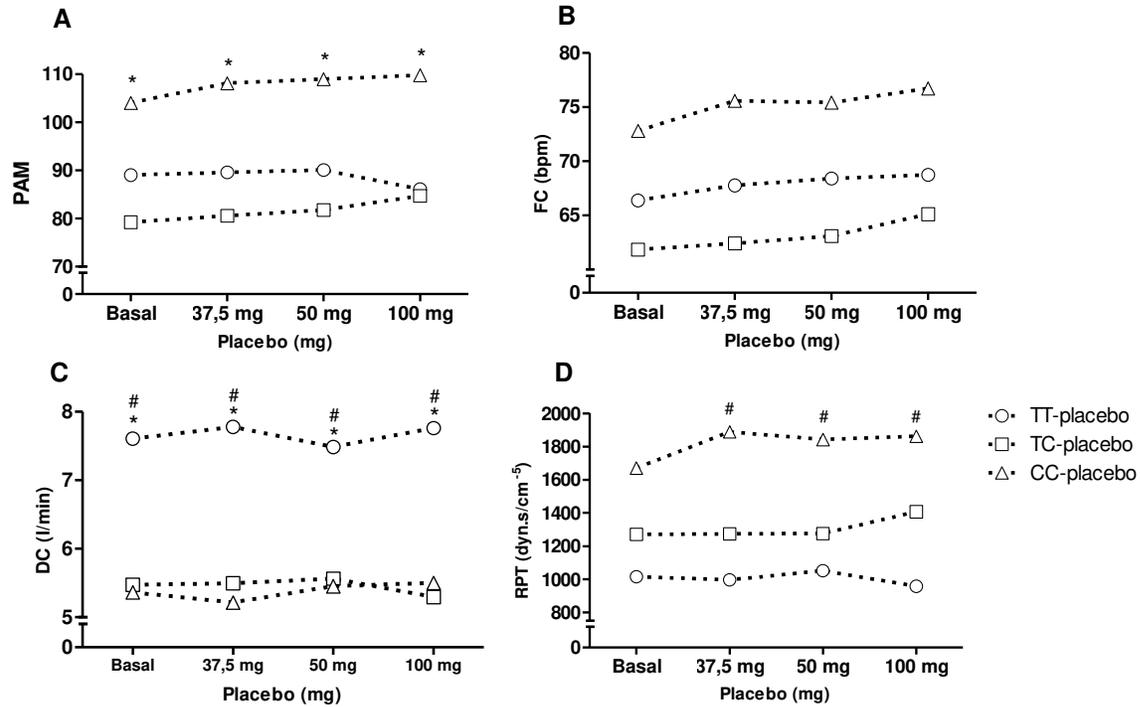


Figura 14. Parâmetros hemodinâmicos no tempo basal e após as doses de placebo divididos por genótipo. A) pressão arterial média (PAM), B) frequência cardíaca (FC), C) débito cardíaco, D) resistência periférica total (RPT). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ TC vs CC (basal e dose correspondente), # $p < 0,05$ vs TT versus CC (dose correspondente).

6.5 Parâmetros de Função Diastólica

6.5.1 Hipertensos Resistentes

A administração de sildenafil melhorou a FDVE nos pacientes hipertensos resistentes considerados como um todo (n= 26) (figura 15). Os seguintes parâmetros da função de relaxamento ventricular esquerdo tiveram redução no protocolo sildenafil (pré versus pós), porém sem diferença pela análise estatística entre os valores (pré versus pós) do protocolo placebo: VAE (25.4 ± 1.1 para 20.9 ± 0.9 mL; pré- e pós- sildenafil, $p < 0.05$); TRIV (104.4 ± 3.8 para 88.3 ± 3.0 ms; pré e pós sildenafil, $p < 0.05$); E/e' lateral (7.7 ± 0.7 para 6.4 ± 0.6 ; pré e pós sildenafil, $p < 0.05$) e E/e' septal (9.8 ± 0.8 to 7.9 ± 0.6 ; pré e pós sildenafil, $p < 0.05$).

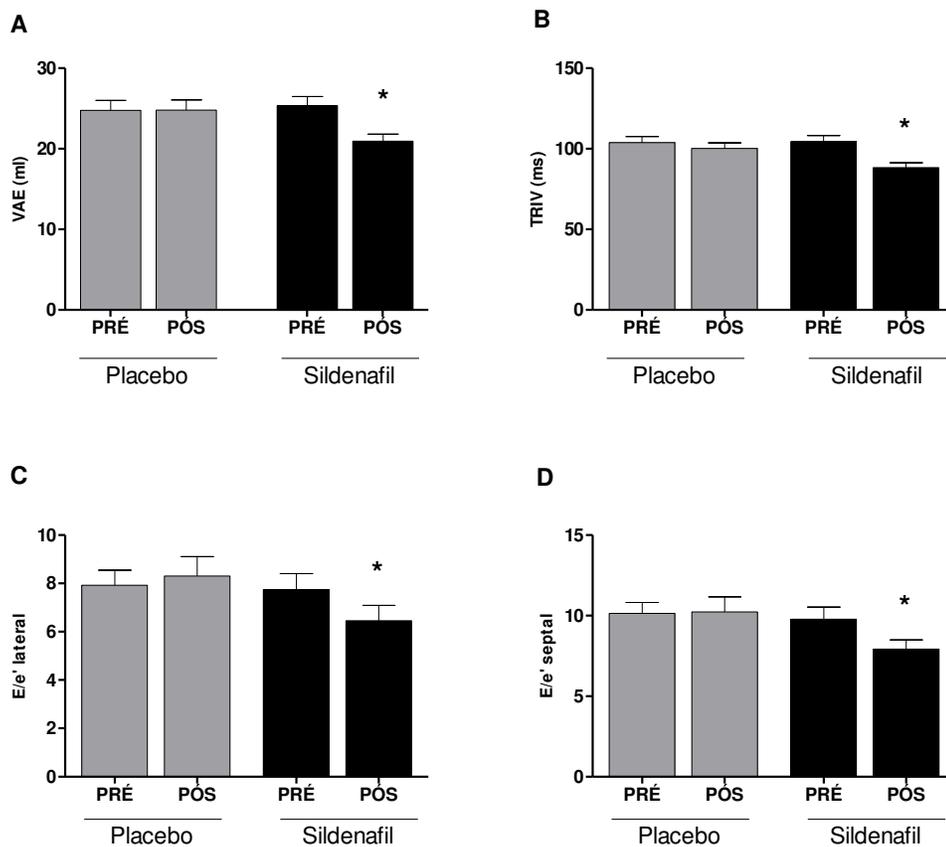


Figura 15. Parâmetros de função diastólica antes (pré) e após (pós) as doses de sildenafil e de placebo, A) volume atrial esquerdo (VAE); B) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV); C) E/e' lateral; D) E/e' septal, Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$: pré versus pós.

6.5.2 Genótipos da eNOS (TT Versus TC Versus CC)

As mudanças nos parâmetros citados não foram consideradas diferentes entre os grupos genotípicos, apesar de tendências observadas (tabela 8 e figura 16).

Tabela 8. Parâmetros de função diastólica e função endotelial dos grupos genotípicos estudados

		TT	TC	CC
VAE (ml/m ²)	PRE	26,3 ± 5,6	25,2 ± 6,5	24,3 ± 5,8
	POS	22,3 ± 4,0	19,4 ± 4,6	20,9 ± 4,7
TRIV (ms)	PRE	112,8 ± 22,9	103,7 ± 13,3	95,5 ± 18,5
	POS	88,4 ± 11,5	85,7 ± 18,2	91,0 ± 16,6
LATERAL	PRE	7,3 ± 1,8	7,2 ± 2,9	8,6 ± 5,2
	POS	6,6 ± 1,3	5,0 ± 1,3	7,9 ± 5,2
SEPTAL	PRE	9,7 ± 2,2	7,9 ± 1,9	11,8 ± 5,8
	POS	7,8 ± 1,1	6,4 ± 1,3	9,7 ± 4,4
VMF (%)	PRE	8,2 ± 1,9	5,4 ± 1,9	7,8 ± 4,2
	POS	8,9 ± 2,6	6,8 ± 2,1	9,2 ± 4,6

VAE: volume atrial esquerdo; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; VMF: vasodilatação mediada pelo fluxo. Valores expressos em média ± desvio padrão.

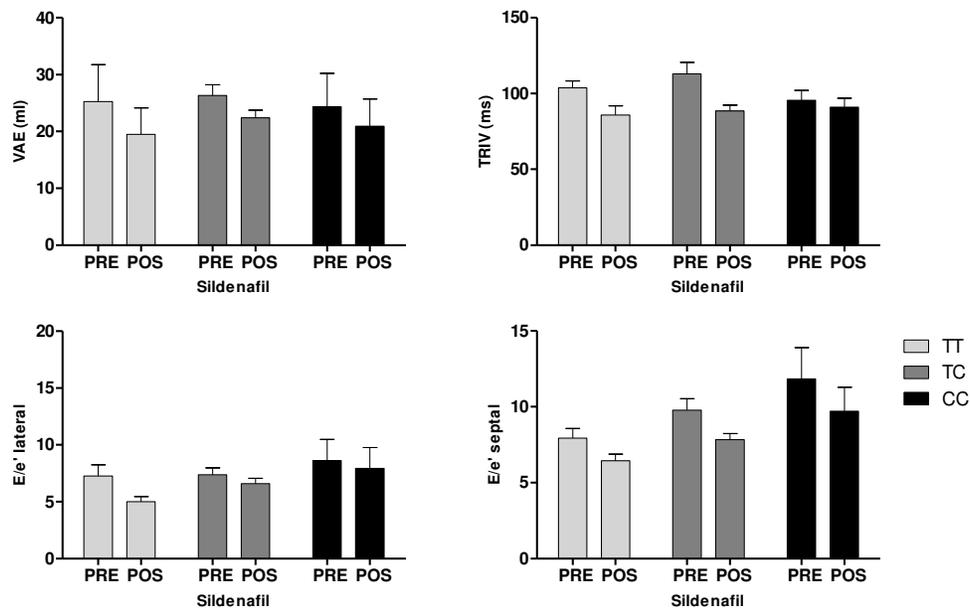


Figura 16. Parâmetros de função diastólica antes (pré) e após (pós) as doses de sildenafil nos grupos genotípicos. A) volume atrial esquerdo (VAE); B) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV); C) E/e' lateral; D) E/e' septal, Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média, * P <0,05: pré versus pós,

6.6 Efeitos Adversos

Dois pacientes relataram tontura auto-limitada durante as 24 horas que seguiram o protocolo sildenafil e um paciente relatou cefaléia que cedeu ao uso de analgésicos. Não houve efeitos adversos relatados durante ou após o protocolo placebo.

Discussão

7 Discussão

O principal achado deste estudo foi que o sildenafil oral melhorou de forma aguda o perfil hemodinâmico (PA e RPT) e a função diastólica do ventrículo esquerdo em pacientes hipertensos resistentes, apesar de não ter havido demonstração de alterações da função endotelial: FMD, níveis plasmáticos de nitrito e GMPC permaneceram inalterados. Além disso, os genótipos do polimorfismo T-786C da eNOS parecem modular a resposta aguda hemodinâmica.

Estudos já demonstraram previamente que a administração de sildenafil reduz a PA em pacientes hipertensos resistentes [77], mas o mecanismo de redução da PA ainda não havia sido investigado. Neste estudo os parâmetros PAM, RPT, DC e FC foram obtidos por um sistema de avaliação hemodinâmica batimento-a-batimento, não-invasivo e contínuo. Este desenho experimental permitiu a detecção de alterações nos parâmetros hemodinâmicos simultaneamente à administração do sildenafil. Observou-se que a redução da PA ocorreu principalmente devido a queda da RPT, uma vez que o débito cardíaco permaneceu inalterado ao longo da avaliação (figura 11). Os deltas da redução da RPT foram significativamente maiores no protocolo sildenafil do que no placebo após a primeira e última doses (37,5 mg; 100 mg) (figura 12). Curiosamente, a maior queda da RPT—média de $173,1 \text{ dyn.s/cm}^{-5}$ —ocorreu após a primeira e menor dose de sildenafil (37,5 mg) em todos os grupos genotípicos. Similarmente, a maior redução da PAM ocorreu após a primeira dose de sildenafil. Esta redução (da PAM) persistiu consistentemente após as doses subsequentes da droga—redução média de 09 mmHg ao final do protocolo (figura 11). Também é interessante notar que a maior queda de RPT (17%) após a primeira dose ocorreu no grupo CC apesar de ter ocorrido uma elevação subsequente da RPT independente das demais doses.

A observação de que a queda máxima de RPT ocorreu após a primeira e menor dose de sildenafil (37,5 mg) confirma achados anteriores que demonstraram redução de RPT (16%), não

relacionada à dose, em homens saudáveis nos quais administrou-se doses endovenosas agudas de sildenafil [332]. Neste estudo não houve evidências de uma relação linear entre doses crescentes e queda da RPT (tabela 3). Apesar disso, estudos de farmacocinética demonstraram um aumento progressivo da biodisponibilidade plasmática da droga em resposta a doses orais progressivamente maiores [44, 369] (figura 4). Demonstrando uma proporcionalidade da dose oral em relação à concentração plasmática, no entanto sem uma resposta hemodinâmica proporcional à dose administrada. Estes dados corroboram com o achado do presente estudo de uma maior queda na RPT com a dose inicial (e menor) de sildenafil, que já causaria um efeito significativo. Denotando que um possível uso clínico poderia ser realizado com baixas doses da droga. Esta é, possivelmente, a primeira vez em que isto é demonstrado em pacientes hipertensos resistentes.

Adicionalmente, o sildenafil melhorou agudamente os parâmetros de FDVE (figura 15). Todos os pacientes eram portadores de disfunção diastólica do VE, dos quais 84% foram classificados como do tipo I (ou tipo IA) e 16% foram classificados como do tipo II. Esta condição não é incomum na vigência de HAR. Neste estudo o VAE, a relação E/e' lateral e septal e o TRIV foram reduzidos após a administração do sildenafil em comparação com os valores basais. A patogenia da disfunção diastólica do VE envolve aumento da pós-carga do VE (resultante da RPT elevada), fato que atrasa o relaxamento do miocárdio, contribuindo assim para aumentar a pressão de enchimento do VE [90]—principal característica da disfunção diastólica do VE [89]. Assim, no presente estudo, os parâmetros de FDVE possivelmente melhoraram devido à redução aguda da RPT e PA.

No entanto, é importante ressaltar, que além deste mecanismo, o NO também desempenha um papel fundamental na regulação da distensibilidade diastólica do VE [97, 98, 370]. O

relaxamento ventricular esquerdo depende da recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e o conseqüente destacamento dos filamentos de miosina e actina [371], A fosforilação de troponina—induzida por NO, via proteína quinase G—reduz a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio favorecendo a distensibilidade do cardiomiócito [96]. Outrossim, um estudo recente demonstrou que sildenafil aumenta a fosforilação da proteína titina levando à melhora da função diastólica *in vivo* [370]. As proteínas de titina são imensos filamentos de polipeptídeos que mantêm a integridade estrutural dos sarcômeros—regulando seu comprimento e controlando sua tensão passiva [372]. Indiretamente, o NO pode ajudar a preservar energia miocárdica e, por esta via, beneficiar o relaxamento miocárdico, que, em parte do processo, consome energia [96, 373]. O possível aumento do efeito de NO, neste estudo, determinado pela ação dos inibidores da PDE5, pode ter desempenhado algum papel na melhora da FDVE destes pacientes. Contudo, estes efeitos são agudos e possivelmente transitórios, portanto não é possível afirmar que possam ser mantidos a longo prazo com o uso crônico de iPDE5 e só estudos de longo prazo poderão determinar esta informação.

Não houve diferença significativa nos resultados de VMF após a administração de sildenafil (figura 9). Em estudo prévio foi demonstrado aumento da VMF após administração oral de sildenafil em hipertensos resistentes. Houve, entretanto, algumas diferenças. A dose oral de sildenafil (duas doses de 50 mg) foi diferente e o tempo de avaliação após a dose foi menor (45 minutos) [357]. Portanto, a maior resposta hemodinâmica ao fármaco talvez ocorra após a primeira dose, entre 30 minutos (início de absorção) e uma hora (t_{max} : tempo para atingir a concentração máxima). A VMF do presente estudo foi avaliada após 1h30min da primeira dose—dose a qual gerou a maior redução da RPT. Também é plausível que os pacientes do nosso estudo tenham desenvolvido grave rigidez arterial e, por isso, a função endotelial esteja gravemente

prejudicada, justificando o achado de ausência de melhora significativa da VMF. Dados recentes revelam que hipertensos resistentes têm medidas indiretas de rigidez arterial (velocidade de onda de pulso) gravemente afetadas e que, por isso, estes pacientes tenham respostas reduzidas de VMF [38]. Outra possível explicação é que os níveis de nitrito plasmáticos encontrados estavam bem abaixo dos considerados normais (acima de 200 nM), principalmente no grupo CC, apesar de não ter havido diferença entre os grupos genotípicos. Talvez a baixa biodisponibilidade de NO não tenha permitido respostas significativas de vasodilatação avaliadas por VMF. Em relação ao GMPc dosado no plasma, uma possível explicação para a ausência de diferença dos seus níveis após as doses de sildenafil pode dever-se ao fato de que o aumento de GMPc esperado tenha ocorrido no compartimento intracelular. Como uma correspondência entre os meios extra e intracelular pode não ser exata, uma avaliação fidedigna deste aumento do GMPc intracelular decorrente da administração de sildenafil pode não ser possível.

Houve modulação da resposta hemodinâmica pelos genótipos do polimorfismo T-786C, fato que não ocorreu em relação aos parâmetros de função diastólica ou da função endotelial. O grupo CC foi o único no qual a RPT retornou aos valores basais após a queda inicial. Assim, após a última dose cumulativa (100 mg), os níveis absolutos de RPT estavam significativamente ($p < 0,05$) maiores no grupo CC do que os respectivos valores do grupo TT (figura 13). Além disso, os valores basais de RPT foram menores no grupo TT do que os correspondentes no grupo TC (também carreador do alelo C) ($p < 0,05$) (figura 13). Apesar de não ter sido considerado significativo, os valores absolutos de RPT, após todas as outras doses, foram menores no grupo TT do que nos demais grupos em ambos os protocolos (sildenafil e placebo). Isso sugere que pacientes de genótipo TT tem menores valores de RPT do que os que portadores do alelo C, apesar de não termos obtido a demonstração por teste estatístico. Além disso, houve uma

tendência estatisticamente significativa em direção a uma menor RPT na medida em que diminui o número de alelos C seguindo as doses consecutivas (37,5 mg, 50 mg e 100 mg) de sildenafil ($p < 0,05$, teste de tendência Jonckheere-Terpstra), mas não quando a PAM foi analisada. Em conformidade com estes resultados, os pacientes do grupo CC apresentaram os maiores níveis de PAM (versus TC) e RPT (versus TT) durante o protocolo placebo (figura 14 A e 14 D).

Estudos *in vitro* demonstraram que a substituição por um alelo C na posição -786 do gene promotor da eNOS reduz a atividade transcricional da enzima em cerca de 50%, culminando com redução de biodisponibilidade de NO (em cerca de 25%) [220]. Com NO menos disponível, haveria uma menor resposta hipotética da via do GMPc, apesar de inibição da PDE5. Ademais, tem sido demonstrado que polimorfismos da eNOS podem modular respostas a drogas, incluindo fármacos anti-hipertensivos [66, 248-250, 374]

Interessantemente, os valores do DC obtidos durante os protocolos sildenafil e placebo foram sempre maiores no grupo TT do que nos grupos portadores do alelo C. Essas diferenças foram consideradas consistentemente significativas ($p < 0,05$), durante todo o protocolo placebo (figura 14 C). No entanto, durante o protocolo sildenafil este efeito não foi significativo pela análise estatística (figura 13 C).

A ausência de diferença nos níveis plasmáticos de nitrito entre os grupos genotípicos pode ter ocorrido devido ao reduzido tamanho da amostra no estudo e, conseqüentemente, baixo poder estatístico para esta avaliação. Seria esperado que os portadores do alelo C apresentassem níveis mais baixos de nitrito. O uso de múltiplas drogas e o fato destes pacientes serem portadores de HAR também podem ter afetado estes resultados. O estudo realizado por Myiamoto *et al.* avaliou níveis de nitrato e nitrito em indivíduos saudáveis que não tomavam nenhuma droga e estavam sob uma dieta controlada para evitar variáveis confundidoras. No entanto, os resultados do estudo

podem suscitar a idéia de que os portadores do alelo C no contexto da HAR tenham uma produção de NO reduzida (ou não sustentada) em resposta a estímulos que pode resultar de uma redução na atividade de transcrição do gene da eNOS no genótipo CC. Outra possibilidade, é um excesso de produtos de estresse oxidativo no grupo CC quando comparado aos demais grupos. Níveis mais elevados de peroxinitrito, superóxido e outras espécies reativas estão associadas a disfunção endotelial pronunciada e neste caso poderiam resultar em menor resposta ao uso do sildenafil.

Algumas limitações do estudo devem ser mencionadas. O desenho simples cego e não-randomizado é uma limitação importante. Essa limitação é mitigada pelo fato de que foi um estudo cruzado e que a monitorização hemodinâmica contínua é independente do operador. Além disso, a baixa prevalência da hipertensão verdadeiramente resistente e a baixa frequência de portadores do alelo C do polimorfismo da eNOS T-786C limita o tamanho da amostra para a avaliação do efeito genótipo nas resposta ao sildenafil. Os resultados referentes ao polimorfismo eNOS têm reduzido poder estatístico, pois o cálculo do tamanho amostral baseou-se na grupo total de hipertensos resistentes e os múltiplos testes de comparação também elevam a probabilidade de resultados positivos devidos ao acaso. Outrossim, a expressão de PDE5 pode ter outros determinantes, células miocárdicas hipertrofiadas têm aumento considerável na expressão de PDE5 [309] assim como células miocárdicas que sofrem sobrecarga de pressão sustentada [375]. Como cada paciente tem um perfil hemodinâmico peculiar, pode ocorrer uma grande variabilidade na expressão miocárdica de PDE5 e conseqüentemente minimizar possíveis efeitos do polimorfismo T-786C. Assim, como um estudo prova de conceito, estes achados originais necessitam serem avaliados em estudos clínicos aleatorizados com maiores populações para determinar sua relevância clínica.

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que iPDE5 melhoram, de forma aguda, o perfil hemodinâmico e parâmetros de função diastólica em pacientes com HAR. O presente estudo reitera o efeito de iPDE5 reduzindo a PA em hipertensos resistentes, particularmente por meio de redução da RPT. Além disso, suscita que estas respostas hemodinâmicas possam ser moduladas pelo polimorfismo T-786C da eNOS. Estudos futuros devem investigar, em maiores populações, os efeitos crônicos de iPDE5 sobre a disfunção diastólica do VE e sobre o perfil hemodinâmico de pacientes hipertensos resistentes, além do papel de polimorfismos da eNOS neste cenário clínico.

Conclusões

8 Conclusões

- 1) A administração oral aguda de sildenafil, comparada com placebo, reduz a pressão arterial de pacientes hipertensos resistentes, principalmente por meio de redução da resistência periférica total.
- 2) A administração oral de sildenafil melhora de forma aguda parâmetros de função diastólica do ventrículo esquerdo em pacientes hipertensos resistentes quando comparada a placebo.
- 3) A melhora do perfil hemodinâmico e da função diastólica ocorreu apesar da função endotelial, e dos níveis plasmáticos de nitrito e GMPc permanecerem inalterados.
- 4) Os genótipos da eNOS T-786C modulam a resposta aguda hemodinâmica, mas não a resposta da função diastólica do ventrículo esquerdo.

Referências

9 Referências

1. Kearney, P.M., et al., *Global burden of hypertension: analysis of worldwide data*. Lancet, 2005. **365**(9455): p. 217-23.
2. Chobanian, A.V., et al., *Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*. Hypertension, 2003. **42**(6): p. 1206-52.
3. Lewington, S., et al., *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, 2002. **360**(9349): p. 1903-13.
4. Egan, B.M., Y. Zhao, and R.N. Axon, *US trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988-2008*. JAMA, 2010. **303**(20): p. 2043-50.
5. Christensen, A.J., et al., *Patient and physician beliefs about control over health: association of symmetrical beliefs with medication regimen adherence*. J Gen Intern Med, 2010. **25**(5): p. 397-402.
6. Hyre, A.D., et al., *Prevalence and predictors of poor antihypertensive medication adherence in an urban health clinic setting*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2007. **9**(3): p. 179-86.
7. O'Connor, P.J., *Overcome clinical inertia to control systolic blood pressure*. Arch Intern Med, 2003. **163**(22): p. 2677-8.
8. Okonofua, E.C., et al., *Therapeutic inertia is an impediment to achieving the Healthy People 2010 blood pressure control goals*. Hypertension, 2006. **47**(3): p. 345-51.
9. Law, M.R., J.K. Morris, and N.J. Wald, *Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies*. BMJ, 2009. **338**: p. b1665.
10. Pimenta, E., et al., *Effects of dietary sodium reduction on blood pressure in subjects with resistant hypertension: results from a randomized trial*. Hypertension, 2009. **54**(3): p. 475-81.
11. Dudenbostel, T. and D.A. Calhoun, *Resistant hypertension, obstructive sleep apnoea and aldosterone*. J Hum Hypertens, 2012. **26**(5): p. 281-7.
12. Mancia, G., et al., *2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)*. J Hypertens, 2013. **31**(7): p. 1281-357.
13. Calhoun, D.A., et al., *Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research*. Circulation, 2008. **117**(25): p. e510-26.
14. Ouzan, J., et al., *The role of spironolactone in the treatment of patients with refractory hypertension*. Am J Hypertens, 2002. **15**(4 Pt 1): p. 333-9.
15. Ubaid-Girioli, S., et al., *Aldosterone excess or escape: Treating resistant hypertension*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2009. **11**(5): p. 245-52.

16. Gaddam, K., et al., *Rapid reversal of left ventricular hypertrophy and intracardiac volume overload in patients with resistant hypertension and hyperaldosteronism: a prospective clinical study*. Hypertension, 2010. **55**(5): p. 1137-42.
17. Acelajado, M.C., et al., *Refractory hypertension: definition, prevalence, and patient characteristics*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2012. **14**(1): p. 7-12.
18. Cuspidi, C., et al., *High prevalence of cardiac and extracardiac target organ damage in refractory hypertension*. J Hypertens, 2001. **19**(11): p. 2063-70.
19. de la Sierra, A., et al., *Clinical differences between resistant hypertensives and patients treated and controlled with three or less drugs*. J Hypertens, 2012. **30**(6): p. 1211-6.
20. Taler, S.J., S.C. Textor, and J.E. Augustine, *Resistant hypertension: comparing hemodynamic management to specialist care*. Hypertension, 2002. **39**(5): p. 982-8.
21. Pierdomenico, S.D., et al., *Cardiovascular outcome in treated hypertensive patients with responder, masked, false resistant, and true resistant hypertension*. Am J Hypertens, 2005. **18**(11): p. 1422-8.
22. Isaksson, H. and J. Ostergren, *Prognosis in therapy-resistant hypertension*. J Intern Med, 1994. **236**(6): p. 643-9.
23. Sarafidis, P.A. and G.L. Bakris, *Resistant hypertension: an overview of evaluation and treatment*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(22): p. 1749-57.
24. Sarafidis, P.A., *Epidemiology of resistant hypertension*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2011. **13**(7): p. 523-8.
25. Salles, G.F., C.R. Cardoso, and E.S. Muxfeldt, *Prognostic influence of office and ambulatory blood pressures in resistant hypertension*. Arch Intern Med, 2008. **168**(21): p. 2340-6.
26. de la Sierra, A., et al., *Clinical features of 8295 patients with resistant hypertension classified on the basis of ambulatory blood pressure monitoring*. Hypertension, 2011. **57**(5): p. 898-902.
27. McAdam-Marx, C., et al., *Results of a retrospective, observational pilot study using electronic medical records to assess the prevalence and characteristics of patients with resistant hypertension in an ambulatory care setting*. Clin Ther, 2009. **31**(5): p. 1116-23.
28. Faria, A.P., et al., *Phenotypic characteristics of resistant hypertension in the Brazilian population*. Arq Bras Cardiol, 2013.
29. de Haro Moraes, C., et al., *High-circulating leptin levels are associated with increased blood pressure in uncontrolled resistant hypertension*. J Hum Hypertens, 2013. **27**(4): p. 225-30.
30. Yakovlevitch, M. and H.R. Black, *Resistant hypertension in a tertiary care clinic*. Arch Intern Med, 1991. **151**(9): p. 1786-92.
31. Garg, J.P., et al., *Resistant hypertension revisited: a comparison of two university-based cohorts*. Am J Hypertens, 2005. **18**(5 Pt 1): p. 619-26.
32. DiBona, G.F., *Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function*. Hypertension, 2000. **36**(6): p. 1083-8.
33. Ferrario, C.M., P.L. Gildenberg, and J.W. McCubbin, *Cardiovascular effects of angiotensin mediated by the central nervous system*. Circ Res, 1972. **30**(3): p. 257-62.

34. Zimmerman, B.G., E.J. Sybertz, and P.C. Wong, *Interaction between sympathetic and renin-angiotensin system*. *J Hypertens*, 1984. **2**(6): p. 581-7.
35. Sowers, J.R., A. Whaley-Connell, and M. Epstein, *Narrative review: the emerging clinical implications of the role of aldosterone in the metabolic syndrome and resistant hypertension*. *Ann Intern Med*, 2009. **150**(11): p. 776-83.
36. Tsioufis, C., et al., *Myocardial and aortic stiffening in the early course of primary aldosteronism*. *Clin Cardiol*, 2008. **31**(9): p. 431-6.
37. Gaddam, K.K., et al., *Characterization of resistant hypertension: association between resistant hypertension, aldosterone, and persistent intravascular volume expansion*. *Arch Intern Med*, 2008. **168**(11): p. 1159-64.
38. Figueiredo, V.N., et al., *Vascular stiffness and endothelial dysfunction: Correlations at different levels of blood pressure*. *Blood Press*, 2012. **21**(1): p. 31-8.
39. Thomopoulos, C., et al., *Obstructive sleep apnoea syndrome is associated with enhanced sub-clinical inflammation and asymmetric dimethyl-arginine levels in hypertensives*. *J Hum Hypertens*, 2009. **23**(1): p. 65-7.
40. Yugar-Toledo, J.C., et al., *Uncontrolled hypertension, uncompensated type II diabetes, and smoking have different patterns of vascular dysfunction*. *Chest*, 2004. **125**(3): p. 823-30.
41. Narkiewicz, K., et al., *Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea*. *Circulation*, 1998. **97**(10): p. 943-5.
42. Esler, M., et al., *Mechanisms of sympathetic activation in obesity-related hypertension*. *Hypertension*, 2006. **48**(5): p. 787-96.
43. Rahmouni, K. and D.A. Morgan, *Hypothalamic arcuate nucleus mediates the sympathetic and arterial pressure responses to leptin*. *Hypertension*, 2007. **49**(3): p. 647-52.
44. Laragh, J., *Laragh's lessons in pathophysiology and clinical pearls for treating hypertension*. *Am J Hypertens*, 2001. **14**(9 Pt 1): p. 837-54.
45. Bobrie, G., et al., *Sequential nephron blockade versus sequential renin-angiotensin system blockade in resistant hypertension: a prospective, randomized, open blinded endpoint study*. *J Hypertens*, 2012. **30**(8): p. 1656-64.
46. Folkow, B. and D. Ely, *Importance of the blood pressure-heart rate relationship*. *Blood Press*, 1998. **7**(3): p. 133-8.
47. Clement, D.L. and D. Duprez, *Circulatory changes in muscle and skin arteries in primary hypertension*. *Hypertension*, 1984. **6**(6 Pt 2): p. III122-7.
48. Lund-Johansen, P., *Twenty-year follow-up of hemodynamics in essential hypertension during rest and exercise*. *Hypertension*, 1991. **18**(5 Suppl): p. III54-61.
49. Krum, H., et al., *Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study*. *Lancet*, 2009. **373**(9671): p. 1275-81.
50. Esler, M.D., et al., *Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2010. **376**(9756): p. 1903-9.
51. Rees, D.D., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(9): p. 3375-8.

52. McVeigh, G.E., et al., *Nitric oxide modulation of blood vessel tone identified by arterial waveform analysis*. Clin Sci (Lond), 2001. **100**(4): p. 387-93.
53. Clarkson, P., et al., *Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease*. Circulation, 1997. **96**(10): p. 3378-83.
54. Konishi, M. and C. Su, *Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries*. Hypertension, 1983. **5**(6): p. 881-6.
55. Winqvist, R.J., et al., *Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats*. J Hypertens, 1984. **2**(5): p. 541-5.
56. Tsioufis, C., et al., *The incremental effect of obstructive sleep apnoea syndrome on arterial stiffness in newly diagnosed essential hypertensive subjects*. J Hypertens, 2007. **25**(1): p. 141-6.
57. Goodfriend, T.L. and D.A. Calhoun, *Resistant hypertension, obesity, sleep apnea, and aldosterone: theory and therapy*. Hypertension, 2004. **43**(3): p. 518-24.
58. Izzard, A.S., et al., *Small artery structure and hypertension: adaptive changes and target organ damage*. J Hypertens, 2005. **23**(2): p. 247-50.
59. Lee, K.W., A.D. Blann, and G.Y. Lip, *High pulse pressure and nondipping circadian blood pressure in patients with coronary artery disease: Relationship to thrombogenesis and endothelial damage/dysfunction*. Am J Hypertens, 2005. **18**(1): p. 104-15.
60. Feinleib, M., et al., *The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results*. Am J Epidemiol, 1977. **106**(4): p. 284-5.
61. Biron, P., J.G. Mongeau, and D. Bertrand, *Blood pressure values in 1116 French-Canadian children*. Can Med Assoc J, 1976. **114**(5): p. 432.
62. Longini, I.M., Jr., et al., *Environmental and genetic sources of familial aggregation of blood pressure in Tecumseh, Michigan*. Am J Epidemiol, 1984. **120**(1): p. 131-44.
63. Harrap, S.B., *Hypertension: genes versus environment*. Lancet, 1994. **344**(8916): p. 169-71.
64. Kim, H.S., et al., *Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2735-9.
65. Williams, J.D. and G.A. Coles, *Proteinuria--a direct cause of renal morbidity?* Kidney Int, 1994. **45**(2): p. 443-50.
66. Silva, P.S., et al., *eNOS and BDKRB2 genotypes affect the antihypertensive responses to enalapril*. Eur J Clin Pharmacol, 2013. **69**(2): p. 167-77.
67. Hiltunen, T.P. and K. Kontula, *Clinical and molecular approaches to individualize antihypertensive drug therapy*. Ann Med, 2012. **44 Suppl 1**: p. S23-9.
68. Sachidanandam, R., et al., *A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 928-33.
69. Sunyaev, S., et al., *Prediction of deleterious human alleles*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(6): p. 591-7.
70. Ng, P.C. and S. Henikoff, *Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function*. Genome Res, 2002. **12**(3): p. 436-46.
71. Risch, N.J., *Searching for genetic determinants in the new millennium*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 847-56.

72. Williams, R.R., et al., *Are there interactions and relations between genetic and environmental factors predisposing to high blood pressure?* Hypertension, 1991. **18**(3 Suppl): p. 129-37.
73. Forte, P., et al., *Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension.* Lancet, 1997. **349**(9055): p. 837-42.
74. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase.* Nature, 1995. **377**(6546): p. 239-42.
75. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. Arq Bras Cardiol, 2010. **95**(1 Suppl): p. 1-51.
76. Ernst, M.E., et al., *Comparative antihypertensive effects of hydrochlorothiazide and chlorthalidone on ambulatory and office blood pressure.* Hypertension, 2006. **47**(3): p. 352-8.
77. Oliver, J.J., J.W. Dear, and D.J. Webb, *Clinical potential of combined organic nitrate and phosphodiesterase type 5 inhibitor in treatment-resistant hypertension.* Hypertension, 2010. **56**(1): p. 62-7.
78. Scheffers, I.J., et al., *Novel baroreflex activation therapy in resistant hypertension: results of a European multi-center feasibility study.* J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(15): p. 1254-8.
79. Redfield, M.M., et al., *Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic.* JAMA, 2003. **289**(2): p. 194-202.
80. Mogelvang, R., et al., *Cardiac dysfunction assessed by echocardiographic tissue Doppler imaging is an independent predictor of mortality in the general population.* Circulation, 2009. **119**(20): p. 2679-85.
81. Inouye, I., et al., *Abnormal left ventricular filling: an early finding in mild to moderate systemic hypertension.* Am J Cardiol, 1984. **53**(1): p. 120-6.
82. Aeschbacher, B.C., et al., *Diastolic dysfunction precedes myocardial hypertrophy in the development of hypertension.* Am J Hypertens, 2001. **14**(2): p. 106-13.
83. Kitzman, D.W., et al., *Importance of heart failure with preserved systolic function in patients > or = 65 years of age. CHS Research Group. Cardiovascular Health Study.* Am J Cardiol, 2001. **87**(4): p. 413-9.
84. Devereux, R.B., et al., *Congestive heart failure despite normal left ventricular systolic function in a population-based sample: the Strong Heart Study.* Am J Cardiol, 2000. **86**(10): p. 1090-6.
85. Zile, M.R. and D.L. Brutsaert, *New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function.* Circulation, 2002. **105**(11): p. 1387-93.
86. Solomon, S.D., et al., *Effect of intensive versus standard blood pressure lowering on diastolic function in patients with uncontrolled hypertension and diastolic dysfunction.* Hypertension, 2010. **55**(2): p. 241-8.
87. Brandt, M.C., et al., *Renal sympathetic denervation reduces left ventricular hypertrophy and improves cardiac function in patients with resistant hypertension.* J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(10): p. 901-9.
88. Leite-Moreira, A.F., *Current perspectives in diastolic dysfunction and diastolic heart failure.* Heart, 2006. **92**(5): p. 712-8.

89. Brutsaert, D.L., S.U. Sys, and T.C. Gillebert, *Diastolic failure: pathophysiology and therapeutic implications*. J Am Coll Cardiol, 1993. **22**(1): p. 318-25.
90. Leite-Moreira, A.F., J. Correia-Pinto, and T.C. Gillebert, *Afterload induced changes in myocardial relaxation: a mechanism for diastolic dysfunction*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(2): p. 344-53.
91. Gillebert, T.C. and W.Y. Lew, *Nonuniformity and volume loading independently influence isovolumic relaxation rates*. Am J Physiol, 1989. **257**(6 Pt 2): p. H1927-35.
92. Paulus, W.J., et al., *How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J, 2007. **28**(20): p. 2539-50.
93. Ladeiras-Lopes, R., J. Ferreira-Martins, and A.F. Leite-Moreira, *Acute neurohumoral modulation of diastolic function*. Peptides, 2009. **30**(2): p. 419-25.
94. Leite-Moreira, A.F., et al., *ET-1 increases distensibility of acutely loaded myocardium: a novel ETA and Na⁺/H⁺ exchanger-mediated effect*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(4): p. H1332-9.
95. Leite-Moreira, A.F., et al., *Angiotensin II acutely decreases myocardial stiffness: a novel AT₁, PKC and Na⁺/H⁺ exchanger-mediated effect*. Br J Pharmacol, 2006. **147**(6): p. 690-7.
96. Paulus, W.J., P.J. Vantrimpont, and A.M. Shah, *Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2070-8.
97. Grocott-Mason, R., et al., *Modulation of left ventricular relaxation in isolated ejecting heart by endogenous nitric oxide*. Am J Physiol, 1994. **267**(5 Pt 2): p. H1804-13.
98. Grocott-Mason, R., et al., *Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting hearts*. Am J Physiol, 1994. **266**(5 Pt 2): p. H1699-705.
99. Shah, A.M., et al., *8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes*. Circ Res, 1994. **74**(5): p. 970-8.
100. Shah, A.M. and P.A. MacCarthy, *Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function*. Pharmacol Ther, 2000. **86**(1): p. 49-86.
101. Kruger, M. and W.A. Linke, *Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension*. J Muscle Res Cell Motil, 2006. **27**(5-7): p. 435-44.
102. Heymes, C., et al., *Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1999. **99**(23): p. 3009-16.
103. Yip, G.W., et al., *Left ventricular long-axis changes in early diastole and systole: impact of systolic function on diastole*. Clin Sci (Lond), 2002. **102**(5): p. 515-22.
104. Kentish, J.C., et al., *Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle*. Circ Res, 2001. **88**(10): p. 1059-65.
105. Noland, T.A., Jr., et al., *Cardiac troponin I mutants. Phosphorylation by protein kinases C and A and regulation of Ca(2+)-stimulated MgATPase of reconstituted actomyosin S-1*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25445-54.

106. Layland, J., J.M. Li, and A.M. Shah, *Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes*. J Physiol, 2002. **540**(Pt 2): p. 457-67.
107. Cazorla, O., et al., *Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(2): p. 370-80.
108. Granzier, H., et al., *Titin: physiological function and role in cardiomyopathy and failure*. Heart Fail Rev, 2005. **10**(3): p. 211-23.
109. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
110. van der Velden, J., et al., *Functional effects of protein kinase C-mediated myofilament phosphorylation in human myocardium*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(4): p. 876-87.
111. Yamasaki, R., et al., *Titin-actin interaction in mouse myocardium: passive tension modulation and its regulation by calcium/S100A1*. Biophys J, 2001. **81**(4): p. 2297-313.
112. Prendergast, B.D., V.F. Sagach, and A.M. Shah, *Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart*. Circulation, 1997. **96**(4): p. 1320-9.
113. Ferreira-Melo, S.E., et al., *Sildenafil preserves diastolic relaxation after reduction by L-NAME and increases phosphodiesterase-5 in the intercalated discs of cardiac myocytes and arterioles*. Clinics (Sao Paulo), 2011. **66**(7): p. 1253-8.
114. Wilson Tang, W.H., et al., *Differential effects of arginine methylation on diastolic dysfunction and disease progression in patients with chronic systolic heart failure*. Eur Heart J, 2008. **29**(20): p. 2506-13.
115. Bronzwaer, J.G. and W.J. Paulus, *Nitric oxide: the missing lusitrope in failing myocardium*. Eur Heart J, 2008. **29**(20): p. 2453-5.
116. Appleton, C.P., L.K. Hatle, and R.L. Popp, *Relation of transmitral flow velocity patterns to left ventricular diastolic function: new insights from a combined hemodynamic and Doppler echocardiographic study*. J Am Coll Cardiol, 1988. **12**(2): p. 426-40.
117. Nagueh, S.F., et al., *Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography*. J Am Soc Echocardiogr, 2009. **22**(2): p. 107-33.
118. Oh, J.K., S.J. Park, and S.F. Nagueh, *Established and novel clinical applications of diastolic function assessment by echocardiography*. Circ Cardiovasc Imaging, 2011. **4**(4): p. 444-55.
119. Rivas-Gotz, C., et al., *Impact of left ventricular ejection fraction on estimation of left ventricular filling pressures using tissue Doppler and flow propagation velocity*. Am J Cardiol, 2003. **91**(6): p. 780-4.
120. Kasner, M., et al., *Utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of diastolic function in heart failure with normal ejection fraction: a comparative Doppler-conductance catheterization study*. Circulation, 2007. **116**(6): p. 637-47.
121. Tsang, T.S., et al., *Left atrial volume as a morphophysiologic expression of left ventricular diastolic dysfunction and relation to cardiovascular risk burden*. Am J Cardiol, 2002. **90**(12): p. 1284-9.
122. Simionescu, M. and N. Simionescu, *Functions of the endothelial cell surface*. Annu Rev Physiol, 1986. **48**: p. 279-93.

123. Vane, J.R., E.E. Anggard, and R.M. Botting, *Regulatory functions of the vascular endothelium*. N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 27-36.
124. Vogel, R.A., *Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review*. Clin Cardiol, 1997. **20**(5): p. 426-32.
125. Luscher, T.F. and M. Barton, *Biology of the endothelium*. Clin Cardiol, 1997. **20**(11 Suppl 2): p. II-3-10.
126. Gimbrone, M.A., Jr., *Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis*. Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 722-6.
127. Wu, K.K. and P. Thiagarajan, *Role of endothelium in thrombosis and hemostasis*. Annu Rev Med, 1996. **47**: p. 315-31.
128. Wu, K.K., *Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis*. J Formos Med Assoc, 1996. **95**(9): p. 661-6.
129. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
130. Walpolia, P.L., et al., *Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(1): p. 2-10.
131. De Caterina, R., *Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2000. **3**(6): p. 453-67.
132. Bassenge, E. and T. Munzel, *Consideration of conduit and resistance vessels in regulation of blood flow*. Am J Cardiol, 1988. **62**(8): p. 40E-44E.
133. Cooke, J.P. and V.J. Dzau, *Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease*. Annu Rev Med, 1997. **48**: p. 489-509.
134. Cooke, J.P. and V.J. Dzau, *Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases*. Circulation, 1997. **96**(2): p. 379-82.
135. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
136. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
137. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
138. Cohen, R.A. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP*. Circulation, 1995. **92**(11): p. 3337-49.
139. Forstermann, U., J.P. Boissel, and H. Kleinert, *Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III)*. FASEB J, 1998. **12**(10): p. 773-90.
140. Ignarro, L.J., *Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by porphyrins and metalloporphyrins*. Adv Pharmacol, 1994. **26**: p. 35-65.
141. Murad, F., *Cyclic GMP: synthesis, metabolism, and function. Introduction and some historical comments*. Adv Pharmacol, 1994. **26**: p. 1-5.
142. Murad, F., *The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate*. JAMA, 1996. **276**(14): p. 1189-92.
143. Hirata, M. and F. Murad, *Interrelationships of cyclic GMP, inositol phosphates, and calcium*. Adv Pharmacol, 1994. **26**: p. 195-216.

144. Warner, T.D., et al., *Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation*. Adv Pharmacol, 1994. **26**: p. 171-94.
145. Sampei, K., et al., *Role of nitric oxide scavenging in vascular response to cell-free hemoglobin transfusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(3): p. H1191-201.
146. Chen, C.A., et al., *S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1115-8.
147. Dattilo, J.B. and R.G. Makhoul, *The role of nitric oxide in vascular biology and pathobiology*. Ann Vasc Surg, 1997. **11**(3): p. 307-14.
148. Zatz, R. and C. Baylis, *Chronic nitric oxide inhibition model six years on*. Hypertension, 1998. **32**(6): p. 958-64.
149. Gimbrone, M.A., Jr., T. Nagel, and J.N. Topper, *Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology*. J Clin Invest, 1997. **99**(8): p. 1809-13.
150. Traub, O. and B.C. Berk, *Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 677-85.
151. Kiely, J.M., et al., *Immunoselective targeting of an anti-thrombin agent to the surface of cytokine-activated vascular endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(8): p. 1211-8.
152. Anderson, T.J., et al., *Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Am J Cardiol, 1995. **75**(6): p. 71B-74B.
153. Flammer, A.J. and T.F. Luscher, *Human endothelial dysfunction: EDRFs*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 1005-13.
154. Virdis, A., L. Ghiadoni, and S. Taddei, *Human endothelial dysfunction: EDCFs*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 1015-23.
155. Vita, J.A. and J.F. Keaney, Jr., *Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk?* Circulation, 2002. **106**(6): p. 640-2.
156. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 168-75.
157. Hamburg, N.M., et al., *Metabolic syndrome, insulin resistance, and brachial artery vasodilator function in Framingham Offspring participants without clinical evidence of cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2008. **101**(1): p. 82-8.
158. Juonala, M., et al., *Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study*. Circulation, 2004. **110**(18): p. 2918-23.
159. Gimbrone, M.A., Jr., T. Nagel, and J.N. Topper, *Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S61-5.
160. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Special communication the critical role of mechanical forces in blood vessel development, physiology and pathology*. J Vasc Surg, 1999. **29**(6): p. 1104-51.
161. Takahashi, M., et al., *Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress*. J Vasc Res, 1997. **34**(3): p. 212-9.
162. Sinoway, L.I., et al., *Characteristics of flow-mediated brachial artery vasodilation in human subjects*. Circ Res, 1989. **64**(1): p. 32-42.

163. Corretti, M.C., 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, 2002. **39**(2): p. 257-65.
164. Betik, A.C., V.B. Luckham, and R.L. Hughson, *Flow-mediated dilation in human brachial artery after different circulatory occlusion conditions*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(1): p. H442-8.
165. Pyke, K.E. and M.E. Tschakovsky, *The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function*. J Physiol, 2005. **568**(Pt 2): p. 357-69.
166. Green, D.J., et al., *Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: does nitric oxide matter?* Hypertension, 2011. **57**(3): p. 363-9.
167. Lauer, T., P. Kleinbongard, and M. Kelm, *Indexes of NO bioavailability in human blood*. News Physiol Sci, 2002. **17**: p. 251-5.
168. Ellis, G., et al., *Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective*. Clin Biochem, 1998. **31**(4): p. 195-220.
169. Kelm, M., et al., *Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 765-72.
170. Kleinbongard, P., et al., *Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(2): p. 295-302.
171. Lauer, T., et al., *Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12814-9.
172. Marsden, P.A., et al., *Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene*. J Biol Chem, 1993. **268**(23): p. 17478-88.
173. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide*. FASEB J, 1995. **9**(13): p. 1319-30.
174. Xu, W., et al., *Molecular genetic analysis of the duplication of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) sequences*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **212**(2): p. 466-72.
175. Elphick, M., et al., *Nitric oxide synthesis in locust olfactory interneurons*. J Exp Biol, 1995. **198**(Pt 3): p. 821-9.
176. Moncada, S., A. Higgs, and R. Furchgott, *International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research*. Pharmacol Rev, 1997. **49**(2): p. 137-42.
177. Moncada, S., *Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **811**: p. 60-7; discussion 67-9.
178. Rodrigo, J., 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, 1997. **378**(4): p. 522-34.
179. Dunn, R.W., et al., *The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration*. Neuropharmacology, 1998. **37**(7): p. 899-904.
180. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.

181. Knowles, R.G., et al., *Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat*. Biochem J, 1990. **270**(3): p. 833-6.
182. Lamas, S., et al., *Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6348-52.
183. Weiner, C.P., et al., *Pregnancy increases guanosine 3',5'-monophosphate in the myometrium independent of nitric oxide synthesis*. Endocrinology, 1994. **135**(6): p. 2473-8.
184. Leber, A., et al., *Characterization of recombinant human endothelial nitric-oxide synthase purified from the yeast Pichia pastoris*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37658-64.
185. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
186. Ghosh, D.K., H.M. Abu-Soud, and D.J. Stuehr, *Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase*. Biochemistry, 1995. **34**(36): p. 11316-20.
187. Andrew, P.J. and B. Mayer, *Enzymatic function of nitric oxide synthases*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 521-31.
188. Giordano, A., et al., *Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus*. FEBS Lett, 2002. **514**(2-3): p. 135-40.
189. Klatt, P., et al., *Determination of nitric oxide synthase cofactors: heme, FAD, FMN, and tetrahydrobiopterin*. Methods Enzymol, 1996. **268**: p. 358-65.
190. List, B.M., 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, 1997. **323 (Pt 1)**: p. 159-65.
191. Raman, C.S., et al., *Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center*. Cell, 1998. **95**(7): p. 939-50.
192. Hecker, M., et al., *Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications*. Biochem J, 1994. **299 (Pt 1)**: p. 247-52.
193. Hirata, K., et al., *Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C*. Hypertension, 1995. **25**(2): p. 180-5.
194. Kim, F., B. Gallis, and M.A. Corson, *TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(5): p. C1057-65.
195. Hoffmann, A., T. Gloe, and U. Pohl, *Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism*. J Cell Physiol, 2001. **188**(1): p. 33-44.
196. Ruehlmann, D.O. and G.E. Mann, *Rapid non-genomic vasodilator actions of oestrogens and sex steroids*. Curr Med Chem, 2000. **7**(5): p. 533-41.
197. Ramasamy, S., S. Parthasarathy, and D.G. Harrison, *Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid*. J Lipid Res, 1998. **39**(2): p. 268-76.
198. Uematsu, M., et al., *Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 1): p. C1371-8.

199. Kanai, A.J., et al., *Shear stress induces ATP-independent transient nitric oxide release from vascular endothelial cells, measured directly with a porphyrinic microsensor*. *Circ Res*, 1995. **77**(2): p. 284-93.
200. Hinshaw, J.E., *Dynamin and its role in membrane fission*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. **16**: p. 483-519.
201. Garcia-Cardena, G., 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*, 1997. **272**(41): p. 25437-40.
202. Cooke, G.E., A. Doshi, and P.F. Binkley, *Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease*. *Pharmacogenomics*, 2007. **8**(12): p. 1723-34.
203. Pereira, T.V., et al., *Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias*. *J Hypertens*, 2007. **25**(9): p. 1763-74.
204. Casas, J.P., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review*. *Am J Epidemiol*, 2006. **164**(10): p. 921-35.
205. Sandrim, V.C., et al., *Vascular endothelial growth factor genotypes and haplotypes are associated with pre-eclampsia but not with gestational hypertension*. *Mol Hum Reprod*, 2009. **15**(2): p. 115-20.
206. Sandrim, V.C., et al., *eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia*. *Pharmacogenomics*, 2008. **9**(10): p. 1467-73.
207. Wang, X.L. and J. Wang, *Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease*. *Mol Genet Metab*, 2000. **70**(4): p. 241-51.
208. Hingorani, A.D., *Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension*. *Curr Hypertens Rep*, 2003. **5**(1): p. 19-25.
209. Nakayama, M., et al., *T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm*. *Circulation*, 1999. **99**(22): p. 2864-70.
210. Poirier, O., et al., *Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study*. *Eur J Clin Invest*, 1999. **29**(4): p. 284-90.
211. Yoshimura, M., et al., *A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese*. *Hum Genet*, 1998. **103**(1): p. 65-9.
212. Miyahara, K., et al., *Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene*. *Eur J Biochem*, 1994. **223**(3): p. 719-26.
213. Tesauro, M., et al., *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*, 2000. **97**(6): p. 2832-5.
214. Hyndman, M.E., et al., *The T-786-->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension*. *Hypertension*, 2002. **39**(4): p. 919-22.
215. Niu, W. and Y. Qi, *An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e24266.

216. Nakayama, M., et al., *T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis*. Am J Cardiol, 2000. **86**(6): p. 628-34.
217. Tanus-Santos, J.E., et al., *Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol*. Pharmacogenetics, 2002. **12**(5): p. 407-13.
218. Cattaruzza, M., et al., *Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease*. Circ Res, 2004. **95**(8): p. 841-7.
219. Venturelli, E., et al., *The T-786C NOS3 polymorphism in Alzheimer's disease: association and influence on gene expression*. Neurosci Lett, 2005. **382**(3): p. 300-3.
220. Miyamoto, Y., et al., *Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(18): p. 2629-37.
221. Marroni, A.S., et al., *Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms*. Nitric Oxide, 2005. **12**(3): p. 177-82.
222. Tanus-Santos, J.E., M. Desai, and D.A. Flockhart, *Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants*. Pharmacogenetics, 2001. **11**(8): p. 719-25.
223. Nakayama, T., et al., *Association analysis of CA repeat polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese*. Clin Genet, 1997. **51**(1): p. 26-30.
224. Miyamoto, Y., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension*. Hypertension, 1998. **32**(1): p. 3-8.
225. Uwabo, J., et al., *Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese*. Am J Hypertens, 1998. **11**(1 Pt 1): p. 125-8.
226. Lacolley, P., et al., *Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects*. J Hypertens, 1998. **16**(1): p. 31-5.
227. Shoji, M., et al., *Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan*. Life Sci, 2000. **66**(26): p. 2557-62.
228. Pulkkinen, A., et al., *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, 2000. **78**(7): p. 372-9.
229. Jachymova, M., 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, 2001. **284**(2): p. 426-30.
230. Chen, W., et al., *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, 2001. **14**(10): p. 1046-52.

231. Tsujita, Y., et al., *Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: The Suita Study*. J Hypertens, 2001. **19**(11): p. 1941-8.
232. Rodriguez-Esparragon, F., 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, 2003. **25**(4): p. 209-20.
233. Jia, C.Q., et al., *[Effects of G894T mutation in the endothelial nitric oxide synthase gene on blood pressure]*. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 2003. **24**(1): p. 36-9.
234. Li, R., 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, 2004. **17**(7): p. 560-7.
235. Chen, W., et al., *Nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) influences arterial stiffness in adults: The Bogalusa Heart Study*. Am J Hypertens, 2004. **17**(7): p. 553-9.
236. Pereira, A.C., 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, 2006. **184**(1): p. 193-200.
237. Bonnardeaux, A., et al., *Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension*. Circulation, 1995. **91**(1): p. 96-102.
238. Kato, N., et al., *Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension*. Hypertension, 1999. **33**(4): p. 933-6.
239. Kajiyama, N., 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, 2000. **23**(6): p. 561-5.
240. Benjafeld, A.V. and B.J. Morris, *Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension*. Am J Hypertens, 2000. **13**(9): p. 994-8.
241. Neugebauer, S., T. Baba, and T. Watanabe, *Association of the nitric oxide synthase gene polymorphism with an increased risk for progression to diabetic nephropathy in type 2 diabetes*. Diabetes, 2000. **49**(3): p. 500-3.
242. Karvonen, J., 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, 2002. **251**(2): p. 102-10.
243. Derebecka, N., et al., *Polymorphism in intron 23 of the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) is not associated with hypertension*. Acta Biochim Pol, 2002. **49**(1): p. 263-8.
244. Kishimoto, T., et al., *eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese*. Prev Med, 2004. **39**(5): p. 927-31.
245. Wolff, B., et al., *Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism, blood pressure and hypertension in a general population sample*. J Hypertens, 2005. **23**(7): p. 1361-6.
246. Lapu-Bula, R., 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, 2005. **97**(2): p. 197-205.

247. Shimasaki, Y., et al., *Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(7): p. 1506-10.
248. Abe, K., et al., *Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the -786T>C polymorphism*. Pharmacogenet Genomics, 2005. **15**(5): p. 329-36.
249. Nagasaki, S., et al., *eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(7): p. 1044-9.
250. Souza-Costa, D.C., et al., *Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene*. Atherosclerosis, 2007. **193**(2): p. 438-44.
251. Nagasaki, S., et al., *eNOS T-786C polymorphism affects atorvastatin-induced changes in erythrocyte membrane fluidity*. Eur J Clin Pharmacol, 2009. **65**(4): p. 385-92.
252. Muniz, J.J., et al., *Endothelial nitric oxide synthase genotypes and haplotypes modify the responses to sildenafil in patients with erectile dysfunction*. Pharmacogenomics J, 2011.
253. Butcher, R.W. and E.W. Sutherland, *Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 1244-50.
254. Rall, T.W. and E.W. Sutherland, *Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles*. J Biol Chem, 1958. **232**(2): p. 1065-76.
255. Charbonneau, H., in *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action* J.A. Beavo and M.D. Houslay, Editors. 1990, John Wiley & Sons, Inc: New York. p. 267-296.
256. Beavo, J.A., M. Conti, and R.J. Heasley, *Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Mol Pharmacol, 1994. **46**(3): p. 399-405.
257. Bolger, G.B., *Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes*. Cell Signal, 1994. **6**(8): p. 851-9.
258. Conti, M., et al., *Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases*. Endocr Rev, 1995. **16**(3): p. 370-89.
259. Degerman, E., P. Belfrange, and V.C. Manganiello, *Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3)*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 6823-6.
260. Houslay, M.D., *Compartmentalization of cyclic AMP phosphodiesterases, signalling 'crosstalk', desensitization and the phosphorylation of Gi-2 add cell specific personalization to the control of the levels of the second messenger cyclic AMP*. Adv Enzyme Regul, 1995. **35**: p. 303-38.
261. Michaeli, T., et al., *Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12925-32.
262. Thompson, W.J., et al., *Regulatory mechanisms of particulate cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1992. **25**: p. 165-84.

263. Underwood, D.C., et al., *Comparison of phosphodiesterase III, IV and dual III/IV inhibitors on bronchospasm and pulmonary eosinophil influx in guinea pigs*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(1): p. 250-9.
264. Soderling, S.H., S.J. Bayuga, and J.A. Beavo, *Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8991-6.
265. Soderling, S.H., S.J. Bayuga, and J.A. Beavo, *Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15553-8.
266. Francis, S.H., I.V. Turko, and J.D. Corbin, *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001. **65**: p. 1-52.
267. Jin, S.L., J.V. Swinnen, and M. Conti, *Characterization of the structure of a low Km, rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterase. Mapping of the catalytic domain*. J Biol Chem, 1992. **267**(26): p. 18929-39.
268. Sonnenburg, W.K., et al., *Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases*. J Biol Chem, 1995. **270**(52): p. 30989-1000.
269. Beavo, J.A., *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms*. Physiol Rev, 1995. **75**(4): p. 725-48.
270. Beavo, J.A. and D.H. Reifsnyder, *Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors*. Trends Pharmacol Sci, 1990. **11**(4): p. 150-5.
271. Conti, M., *Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(9): p. 1317-27.
272. Conti, M. and S.L. Jin, *The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1999. **63**: p. 1-38.
273. Houslay, M.D. and D.R. Adams, *PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 1): p. 1-18.
274. Houslay, M.D. and W. Kolch, *Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(4): p. 659-68.
275. Manganiello, V.C. and E. Degerman, *Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): diverse regulators of cyclic nucleotide signals and inviting molecular targets for novel therapeutic agents*. Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 407-11.
276. Soderling, S.H. and J.A. Beavo, *Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(2): p. 174-9.
277. Burgers, P.M., et al., *Stereochemistry of hydrolysis of adenosine 3':5'-cyclic phosphorothioate by the cyclic phosphodiesterase from beef heart*. J Biol Chem, 1979. **254**(20): p. 9959-61.
278. Goldberg, N.D., et al., *18O-Labeling of guanosine monophosphate upon hydrolysis of cyclic guanosine 3':5'-monophosphate by phosphodiesterase*. J Biol Chem, 1980. **255**(21): p. 10344-7.
279. Hardman, J.G., *Cyclic nucleotides and regulation of vascular smooth muscle*. J Cardiovasc Pharmacol, 1984. **6**(Suppl 4): p. S639-45.

280. Lincoln, T.M., et al., *cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases*. *Adv Pharmacol*, 1995. **34**: p. 305-22.
281. Biel, M., et al., *Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1999. **135**: p. 151-71.
282. Lohmann, S.M., et al., *Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases*. *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(8): p. 307-12.
283. Juilfs, D.M., et al., *Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs)*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1999. **135**: p. 67-104.
284. Boolell, M., et al., *Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction*. *Int J Impot Res*, 1996. **8**(2): p. 47-52.
285. Waldman, S.A. and F. Murad, *Cyclic GMP synthesis and function*. *Pharmacol Rev*, 1987. **39**(3): p. 163-96.
286. Jackson, G., *Phosphodiesterase 5 inhibition: effects on the coronary vasculature*. *Int J Clin Pract*, 2001. **55**(3): p. 183-8.
287. Rybalkin, S.D. and K.E. Bornfeldt, *Cyclic nucleotide phosphodiesterases and human arterial smooth muscle cell proliferation*. *Thromb Haemost*, 1999. **82**(2): p. 424-34.
288. Singh, J. and F.W. Flitney, *Inotropic responses of the frog ventricle to dibutyryl cyclic AMP and 8-bromo cyclic GMP and related changes in endogenous cyclic nucleotide levels*. *Biochem Pharmacol*, 1981. **30**(12): p. 1475-81.
289. Trautwein, W. and G. Trube, *Negative inotropic effect of cyclic GMP in cardiac fiber fragments*. *Pflugers Arch*, 1976. **366**(2-3): p. 293-5.
290. Nawrath, H., *Does cyclic GMP mediate the negative inotropic effect of acetylcholine in the heart?* *Nature*, 1977. **267**(5607): p. 72-4.
291. Trautwein, W., J. Taniguchi, and A. Noma, *The effect of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells*. *Pflugers Arch*, 1982. **392**(4): p. 307-14.
292. Bkaily, G. and N. Sperelakis, *Injection of guanosine 5'-cyclic monophosphate into heart cells blocks calcium slow channels*. *Am J Physiol*, 1985. **248**(5 Pt 2): p. H745-9.
293. Mehegan, J.P., et al., *Electrophysiological effects of cyclic GMP on canine cardiac Purkinje fibers*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1985. **7**(1): p. 30-5.
294. Wahler, G.M. and N. Sperelakis, *Intracellular injection of cyclic GMP depresses cardiac slow action potentials*. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*, 1985. **10**(1): p. 83-95.
295. Waldmann, R. and U. Walter, *Cyclic nucleotide elevating vasodilators inhibit platelet aggregation at an early step of the activation cascade*. *Eur J Pharmacol*, 1989. **159**(3): p. 317-20.
296. Murad, F., et al., *The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction pathway in vascular smooth muscle preparations and other tissues*. *Jpn J Pharmacol*, 1992. **58 Suppl 2**: p. 150P-157P.
297. Hofmann, F., *The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(1): p. 1-4.
298. Sawada, N., et al., *Cyclic GMP kinase and RhoA Ser188 phosphorylation integrate pro- and antifibrotic signals in blood vessels*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(22): p. 6018-32.

299. Koitabashi, N., et al., *Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(4): p. 713-24.
300. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. Genes Dev, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
301. Jeremy, J.Y., et al., *Effects of sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, and papaverine on cyclic GMP and cyclic AMP levels in the rabbit corpus cavernosum in vitro*. Br J Urol, 1997. **79**(6): p. 958-63.
302. Wallis, R.M., et al., *Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro*. Am J Cardiol, 1999. **83**(5A): p. 3C-12C.
303. Glossmann, H., G. Petrischor, and G. Bartsch, *Molecular mechanisms of the effects of sildenafil (VIAGRA)*. Exp Gerontol, 1999. **34**(3): p. 305-18.
304. Loughney, K., et al., *Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase*. Gene, 1998. **216**(1): p. 139-47.
305. McAllister-Lucas, L.M., et al., *An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30671-9.
306. Senzaki, H., et al., *Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure*. FASEB J, 2001. **15**(10): p. 1718-26.
307. Giordano, D., et al., *Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1539**(1-2): p. 16-27.
308. Rybalkin, S.D., et al., *PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain*. Embo J, 2003. **22**(3): p. 469-78.
309. Takimoto, E., et al., *Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 214-22.
310. Zhang, M., et al., *Expression, activity, and pro-hypertrophic effects of PDE5A in cardiac myocytes*. Cell Signal, 2008. **20**(12): p. 2231-6.
311. Wang, H., et al., *Phosphodiesterase 5 restricts NOS3/Soluble guanylate cyclase signaling to L-type Ca²⁺ current in cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(2): p. 304-14.
312. Corbin, J., et al., *Sildenafil citrate does not affect cardiac contractility in human or dog heart*. Curr Med Res Opin, 2003. **19**(8): p. 747-52.
313. Yanaka, N., et al., *cGMP-phosphodiesterase activity is up-regulated in response to pressure overload of rat ventricles*. Biosci Biotechnol Biochem, 2003. **67**(5): p. 973-9.
314. Nagayama, T., et al., *Sustained soluble guanylate cyclase stimulation offsets nitric-oxide synthase inhibition to restore acute cardiac modulation by sildenafil*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **326**(2): p. 380-7.
315. Jackson, G., *Hemodynamic and exercise effects of phosphodiesterase 5 inhibitors*. Am J Cardiol, 2005. **96**(12B): p. 32M-36M.
316. Carson, C.C., 3rd, *Cardiac safety in clinical trials of phosphodiesterase 5 inhibitors*. Am J Cardiol, 2005. **96**(12B): p. 37M-41M.

317. Kass, D.A., H.C. Champion, and J.A. Beavo, *Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation*. *Circ Res*, 2007. **101**(11): p. 1084-95.
318. Kass, D.A., et al., *Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling*. *Cardiovasc Res*, 2007. **75**(2): p. 303-14.
319. Ziolo, M.T., M.J. Kohr, and H. Wang, *Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function*. *J Mol Cell Cardiol*, 2008. **45**(5): p. 625-32.
320. Nagayama, T., et al., *Pressure-overload magnitude-dependence of the anti-hypertrophic efficacy of PDE5A inhibition*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(4): p. 560-7.
321. Nagayama, T., et al., *Sildenafil stops progressive chamber, cellular, and molecular remodeling and improves calcium handling and function in hearts with pre-existing advanced hypertrophy caused by pressure overload*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **53**(2): p. 207-15.
322. Kukreja, R.C., et al., *Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition--a novel preconditioning strategy*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **36**(2): p. 165-73.
323. Ockaili, R., et al., *Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(3): p. H1263-9.
324. Ballard, S.A., et al., *Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes*. *J Urol*, 1998. **159**(6): p. 2164-71.
325. Rybalkin, S.D., et al., *Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function*. *Circ Res*, 2003. **93**(4): p. 280-91.
326. Stowe, F. and E. Novalija, *Phosphodiesterase type 5 inhibition enhances vasorelaxation caused by nitroprusside in guinea pig intact heart and isolated aorta*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000. **36**(2): p. 162-8.
327. Koyama, H., et al., *Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation*. *J Cell Physiol*, 2001. **186**(1): p. 1-10.
328. Kemp-Harper, B. and H.H. Schmidt, *cGMP in the vasculature*. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(191): p. 447-67.
329. Rosano, G.M., et al., *Chronic treatment with tadalafil improves endothelial function in men with increased cardiovascular risk*. *Eur Urol*, 2005. **47**(2): p. 214-20; discussion 220-2.
330. Aversa, A., et al., *Chronic sildenafil in men with diabetes and erectile dysfunction*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2007. **3**(3): p. 451-64.
331. Boolell, M., et al., *Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction*. *Int J Impot Res*, 1996. **8**(2): p. 47-52.
332. Jackson, G., et al., *Effects of sildenafil citrate on human hemodynamics*. *Am J Cardiol*, 1999. **83**(5A): p. 13C-20C.
333. Nichols, D.J., G.J. Muirhead, and J.A. Harness, *Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality*. *Br J Clin Pharmacol*, 2002. **53 Suppl 1**: p. 5S-12S.
334. Corbin, J.D. and S.H. Francis, *Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(20): p. 13729-32.

335. Corbin, J.D. and S.H. Francis, *Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors*. Int J Clin Pract, 2002. **56**(6): p. 453-9.
336. Cheitlin, M.D., et al., *Use of sildenafil (Viagra) in patients with cardiovascular disease. Technology and Practice Executive Committee*. Circulation, 1999. **99**(1): p. 168-77.
337. Michelakis, E., et al., *Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide*. Circulation, 2002. **105**(20): p. 2398-403.
338. Fisher, P.W., et al., *Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity*. Circulation, 2005. **111**(13): p. 1601-10.
339. Maggiorini, M., et al., *Both tadalafil and dexamethasone may reduce the incidence of high-altitude pulmonary edema: a randomized trial*. Ann Intern Med, 2006. **145**(7): p. 497-506.
340. Zhao, L., et al., *Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Circulation, 2001. **104**(4): p. 424-8.
341. Fries, R., et al., *Sildenafil in the treatment of Raynaud's phenomenon resistant to vasodilatory therapy*. Circulation, 2005. **112**(19): p. 2980-5.
342. Oliver, J.J., V.P. Melville, and D.J. Webb, *Effect of regular phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension*. Hypertension, 2006. **48**(4): p. 622-7.
343. Katz, S.D., et al., *Acute type 5 phosphodiesterase inhibition with sildenafil enhances flow-mediated vasodilation in patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(3): p. 845-51.
344. Gillies, H.C., D. Roblin, and G. Jackson, *Coronary and systemic hemodynamic effects of sildenafil citrate: from basic science to clinical studies in patients with cardiovascular disease*. Int J Cardiol, 2002. **86**(2-3): p. 131-41.
345. Feldman, A.M. and D.M. McNamara, *Reevaluating the role of phosphodiesterase inhibitors in the treatment of cardiovascular disease*. Clin Cardiol, 2002. **25**(6): p. 256-62.
346. McAuley, I.W., et al., *Intracavernosal sildenafil facilitates penile erection independent of the nitric oxide pathway*. J Androl, 2001. **22**(4): p. 623-8.
347. Dishy, V., et al., *The effect of sildenafil on nitric oxide-mediated vasodilation in healthy men*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **70**(3): p. 270-9.
348. Mochida, H., et al., *Sildenafil and T-1032, phosphodiesterase type 5 inhibitors, showed a different vasorelaxant property in the isolated rat aorta*. Eur J Pharmacol, 2002. **440**(1): p. 45-52.
349. Bischoff, E. and K. Schneider, *A conscious-rabbit model to study vardenafil hydrochloride and other agents that influence penile erection*. Int J Impot Res, 2001. **13**(4): p. 230-5.
350. Vila-Petroff, M.G., et al., *Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes*. Circ Res, 1999. **84**(9): p. 1020-31.
351. Traverse, J.H., et al., *Cyclic nucleotide phosphodiesterase type 5 activity limits blood flow to hypoperfused myocardium during exercise*. Circulation, 2000. **102**(24): p. 2997-3002.
352. Chen, Y., et al., *Effect of sildenafil on coronary active and reactive hyperemia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(5): p. H2319-25.
353. Blumenfeld, J.D. and J.H. Laragh, *Management of hypertensive crises: the scientific basis for treatment decisions*. Am J Hypertens, 2001. **14**(11 Pt 1): p. 1154-67.

354. Schwartz, B.G. and R.A. Kloner, *Drug interactions with phosphodiesterase-5 inhibitors used for the treatment of erectile dysfunction or pulmonary hypertension*. *Circulation*, 2010. **122**(1): p. 88-95.
355. Das, A., L. Xi, and R.C. Kukreja, *Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(13): p. 12944-55.
356. Nagendran, J., et al., *Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility*. *Circulation*, 2007. **116**(3): p. 238-48.
357. Yugar-Toledo, J.C., et al., *Cyclic guanosine monophosphate phosphodiesterase-5 inhibitor promotes an endothelium NO-dependent-like vasodilation in patients with refractory hypertension*. *Nitric Oxide*, 2007. **16**(3): p. 315-21.
358. Mahmud, A., M. Hennessy, and J. Feely, *Effect of sildenafil on blood pressure and arterial wave reflection in treated hypertensive men*. *J Hum Hypertens*, 2001. **15**(10): p. 707-13.
359. Vardi, Y., et al., *Effects of sildenafil citrate (viagra) on blood pressure in normotensive and hypertensive men*. *Urology*, 2002. **59**(5): p. 747-52.
360. Sackett, D.L., et al., *Randomised clinical trial of strategies for improving medication compliance in primary hypertension*. *Lancet*, 1975. **1**(7918): p. 1205-7.
361. Gropelli, A., et al., *Evaluation of noninvasive blood pressure monitoring devices Spacelabs 90202 and 90207 versus resting and ambulatory 24-hour intra-arterial blood pressure*. *Hypertension*, 1992. **20**(2): p. 227-32.
362. Wesseling, K.H., et al., *Computation of aortic flow from pressure in humans using a nonlinear, three-element model*. *J Appl Physiol*, 1993. **74**(5): p. 2566-73.
363. Bos, W.J., et al., *Reconstruction of brachial artery pressure from noninvasive finger pressure measurements*. *Circulation*, 1996. **94**(8): p. 1870-5.
364. Parati, G., et al., *Comparison of finger and intra-arterial blood pressure monitoring at rest and during laboratory testing*. *Hypertension*, 1989. **13**(6 Pt 1): p. 647-55.
365. Imholz, B.P., et al., *Continuous non-invasive blood pressure monitoring: reliability of Finapres device during the Valsalva manoeuvre*. *Cardiovasc Res*, 1988. **22**(6): p. 390-7.
366. Imholz, B.P., et al., *Feasibility of ambulatory, continuous 24-hour finger arterial pressure recording*. *Hypertension*, 1993. **21**(1): p. 65-73.
367. Jansen, J.R., et al., *A comparison of cardiac output derived from the arterial pressure wave against thermodilution in cardiac surgery patients*. *Br J Anaesth*, 2001. **87**(2): p. 212-22.
368. Lang, R.M., et al., *Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2005. **18**(12): p. 1440-63.
369. Kjeldsen, S.E., et al., *Characteristics of 15,314 hypertensive patients at high coronary risk. The VALUE trial. The Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation*. *Blood Press*, 2001. **10**(2): p. 83-91.
370. Bishu, K., et al., *Sildenafil and B-type natriuretic peptide acutely phosphorylate titin and improve diastolic distensibility in vivo*. *Circulation*, 2011. **124**(25): p. 2882-91.

371. Ramirez-Correa, G.A. and A.M. Murphy, *Is phospholamban or troponin I the "prima donna" in beta-adrenergic induced lusitropy?* Circ Res, 2007. **101**(4): p. 326-7.
372. Granzier, H., et al., *Titin elasticity and mechanism of passive force development in rat cardiac myocytes probed by thin-filament extraction.* Biophys J, 1997. **73**(4): p. 2043-53.
373. Paulus, W.J. and J.G. Bronzwaer, *Nitric oxide's role in the heart: control of beating or breathing?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(1): p. H8-13.
374. Turner, S.T., et al., *Effects of endothelial nitric oxide synthase, alpha-adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide.* Am J Hypertens, 2003. **16**(10): p. 834-9.
375. Zhang, M., et al., *Myocardial remodeling is controlled by myocyte-targeted gene regulation of phosphodiesterase type 5.* J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(24): p. 2021-30.