CAROLINA TOSIN BUENO

**Avaliações farmacometabolômicas e de ancestralidade
genética em pacientes hipertensos de um estudo
clínico randomizado**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Paulo Caleb Júnior de
Lima Santos

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2018**

CAROLINA TOSIN BUENO

**Avaliações farmacometabolômicas e de ancestralidade
genética em pacientes hipertensos de um estudo
clínico randomizado**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Paulo Caleb Júnior de
Lima Santos

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bueno, Carolina Tosin

Avaliações farmacometabolômicas e de ancestralidade genética em pacientes hipertensos de um estudo clínico randomizado / Carolina Tosin Bueno. -- São Paulo, 2018.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Paulo Caleb Júnior de Lima Santos.

Descritores: 1. Hipertensão 2. Genética humana 3. Doenças cardiovasculares 4. Anti-hipertensivos 5. Química analítica 6. Grupos de populações continentais

USP/FM/DBD-349/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus e às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, noivo, irmãos, sobrinhos, cunhados e amigos. Eu não conquistaria nada se não estivessem ao meu lado. Obrigada por me ajudarem a acreditar que eu era capaz de conquistar este sonho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Caleb Júnior de Lima Santos, pela oportunidade de me deixar fazer parte de sua equipe, cuidar de um de seus projetos como se fosse meu, me ensinar a ser uma pesquisadora e aprender cada dia mais. Muito obrigada por toda a sua dedicação, ajuda e atenção.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, principalmente, ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração, em nome do diretor Prof. Dr. José Eduardo Krieger, e ao colaborador, Prof. Dr. Alexandre da Costa Pereira, pela oportunidade de realização do curso de doutorado no LGCM.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas aulas e pelas oportunidades que me proporcionou.

A todos os funcionários e alunos do LGCM e também do LATF-Unifal: obrigada pela amizade e ajuda sempre que necessária. Aqui fica um agradecimento especial ao Prof. Eduardo e ao seu aluno Henrique que me ajudaram de forma indescritível e me acolheram em sua equipe, possibilitando que a parte analítica fosse realizada com maestria.

A todos os pacientes incluídos no protocolo de pesquisa ReHOT: sem eles este trabalho não seria possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão dos recursos financeiros para a execução deste projeto de pesquisa (2013/09295-3) e também pela bolsa de doutorado concedida (2013/24440-0).

À minha família, por sua capacidade de acreditar em mim, investir em mim e me dar todo o sustento, o amor, o cuidado, o carinho e a proteção que eu precisava. Mãe, pai, irmãos, cunhados, sobrinhos e família: vocês sempre serão a minha base de amor e tudo que preciso para lutar por qualquer sonho e não ter medo de nenhum obstáculo. Vocês são tudo para mim.

Ao meu noivo e pessoa com quem desejo partilhar minha vida. Obrigado pelo carinho, conforto e abrigo na correria e no estresse do dia a dia – e olha que esses últimos meses, com toda certeza, não foram nada fáceis!

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Não há dúvida que, sem vocês ao meu lado, eu também não estaria aqui – como é bom poder contar com vocês.

Por fim, e não menos importante, a quem possibilitou que todas essas pessoas entrassem na minha vida e que tudo isso fosse possível, Deus, fonte da vida e que me deu a oportunidade de aqui estar e poder lutar pelos meus sonhos.

Aqui se concretiza um sonho. Gratidão por merecer chegar até aqui.

Epígrafe

*“Se você pensa que é um derrotado, você será derrotado.
Se não pensar ‘quero a qualquer custo!’, não conseguirá nada.
Mesmo que você queira vencer, mas pensa que não vai conseguir,
a vitória não sorrirá para você.
Se você fizer as coisas pela metade, você será fracassado.
Nós descobrimos, neste mundo, que o sucesso começa pela intenção da gente
e tudo se determina pelo nosso espírito.
Se você pensa que é um malogrado, você se torna como tal.
Se almeja atingir uma posição mais elevada, deve, antes de obter a vitória,
dotar-se da convicção de que conseguirá infalivelmente.
A luta pela vida nem sempre é vantajosa, aos fortes nem aos espertos.
Mais cedo ou mais tarde, quem cativa a vitória é aquele que crê plenamente:
Eu conseguirei!”*

Filosofia do Sucesso - Napoleon Hill

Normatização

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas
dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Ficha catalográfica	3
Dedicatória.....	4
Agradecimentos	6
Epígrafe.....	9
Normatização	11
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas	iv
Lista de Tabelas	vi
Lista de Figuras	viii
Resumo	ix
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1 Hipertensão Arterial.....	2
1.2 Hipertensão Resistente.....	5
1.3 Tratamentos da Hipertensão.....	6
1.3.1 Diuréticos	6
1.3.2 Inibidores Adrenérgicos de Ação Central	7
1.3.3 Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina	7
1.3.4 Antagonistas dos Receptores da Angiotensina II.....	8
1.3.5 Bloqueadores dos Canais de Cálcio	9
1.4 Estudos Farmacometabolômicos	9
1.5 Estudos de Ancestralidade Genética.....	11
2. Objetivos	13
3. Materiais e métodos.....	15
3.1 Casuística	16
3.2 Comitê de Ética em Pesquisa.....	18
3.3 Delineamento do Estudo ReHOT	19

3.4 Análises Farmacometabolômicas	22
3.4.1 Preparo dos Nanotubos de Carbono de Acesso Restrito (RACNTs).....	22
3.4.2 Caracterização dos RACNTs.....	24
3.4.3 Equipamentos Utilizados.....	25
3.4.4 Reagentes e Soluções.....	25
3.4.5 Parâmetros Analíticos.....	26
3.4.6 Configuração do Sistema Column Switching	28
3.4.7 Amostras Analisadas	32
3.5 Análises de Ancestralidade	32
3.5.1 Técnica de OpenArray™	33
3.5.2 Amostras Analisadas	36
3.5.2 Metodologia Estatística para as Análises de Ancestralidade	37
4. Resultados.....	38
4.1 Resultados Farmacometabolômicos	41
4.1.1 Otimização do Método Analítico	41
4.1.2 Síntese e Caracterização de RACNTs.....	47
4.1.3 Validação Analítica.....	48
4.1.4 Resultados da Mesuração Analítica	56
4.2 Resultados de Ancestralidade	61
5. Discussão	69
5.1 Análises Farmacometabolômicas	70
5.2 Análises de Ancestralidade Genética	75
6. Conclusões.....	78
7. Anexos	80
Anexo A – Frequência alélica dos Marcadores Informativos de Ancestralidade	81
Anexo B - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	85
Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	91
8. Referências	95

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

AFR	Africano
AG	Ancestralidade genética
AIMs	Ancestry Informative Markers
AMR	Ameríndio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEU	Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European Ancestry
CVD	Cardiovascular disease
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EUR	Europeu
eV	Eletrovolt
g	Força de rotação gravitacional
HA	Hipertensão arterial
HapMap	The International HapMap Project
HGDP	Human Genome Diversity Project
HR	Hipertensão resistente
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de Massa Corporal
InCor	Instituto do Coração, São Paulo – SP
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mM	Milimolar
N	Número total
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmol	Picomol
RPM	Rotação por Minuto
s	Segundos
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UI	Unidades Internacionais
1000 G	1000 Genomes
°C	Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Lista de Tabelas

Tabela 1. Analitos e seus respectivos precursores, bem como fragmentos e energia de colisão otimizada.....	29
Tabela 2. Características clínicas e demográficas entre pacientes resistentes e não resistentes do estudo ReHOT.....	41
Tabela 3. Diferenças na pressão arterial em diferentes tempos de mensuração dos pacientes resistentes e não resistentes do estudo ReHOT.....	42
Tabela 4. Parâmetros de validação obtidos na determinação dos fármacos anti-hipertensivos em soro humano.....	53
Tabela 5. Mensurações da média dos analitos comparados entre os grupos de medicamentos e entre os indivíduos responsivos e não responsivos.....	59
Tabela 6. Valores de β referentes à comparação da mensuração dos analitos <i>versus</i> o delta das pressões sistólicas e diastólicas dos indivíduos que fizeram uso de enalapril e losartana.....	60
Tabela 7. Valores de β referentes à comparação da mensuração dos analitos <i>versus</i> o delta das pressões sistólicas e diastólicas dos indivíduos que fizeram uso de espironolactona e clonidina.....	61
Tabela 8. Características gerais e clínicas dos pacientes entre os grupos de raça autodeclarada.....	63
Tabela 9. Associação da proporção de ancestralidade com raça autodeclarada.....	64
Tabela 10. Associação da proporção de ancestralidade e pacientes	

hipertensos resistentes ou não resistentes.....	64
Tabela 11. Indivíduos hipertensos resistentes e não resistentes <i>versus</i> raça autodeclarada.....	65
Tabela 12. Associação da proporção de ancestralidade e resposta ao tratamento anti-hipertensivo nos diferentes grupos de tratamento medicamentoso.....	66
Tabela 13. Associação da proporção de ancestralidade e variações de pressão arterial sistólica e diastólica nas diferentes visitas e grupos de tratamento medicamentoso.....	68
Tabela 14. Comparação do método proposto com alguns métodos anteriores para a determinação dos analitos.....	74

Lista de Figuras

Figura 1. Foto ilustrativa da coluna utilizada.....	24
Figura 2. Sistema <i>column switching</i> em configuração <i>backflush</i> empregando a coluna RACNT.....	32
Figura 3. <i>Chip</i> de OpenArray da Applied Biosystems™.....	35
Figura 4. Processo do ensaio de genotipagem por RT-PCR da Applied Biosystems™.....	36
Figura 5. Número de pacientes incluídos e perdas de seguimento de pacientes do estudo ReHOT.....	40
Figura 6. Sinal obtido pelo detector UV acoplado ao sistema LC.....	47
Figura 7. Sinais analíticos obtidos a partir da injeção de 100 µL da solução padrão BSA 44 mg mL ⁻¹ sem (A) e com (B) a coluna RACNTs.....	49
Figura 8. Cromatograma do soro branco (pool n = 10). A- LOS-d4; B- CND-d4; C- ENT; D- LOS; E- LCA; F- N2G; G- SPL; H- CND; I- AML; J- ELP.....	55
Figura 9. Cromatograma do soro dopado com o nível médio de calibração dos analitos adicionados com os padrões internos.....	56
Figura 10. Cromatograma do soro dopado com o nível elevado de calibração dos analitos adicionados com os padrões internos.....	56

Resumo

Bueno CT. *Avaliações farmacometabolômicas e de ancestralidade genética em pacientes hipertensos de um estudo clínico randomizado* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: Pacientes hipertensos resistentes (HR) são indivíduos com pressão arterial não controlada – apesar do tratamento com um diurético e dois anti-hipertensivos com mecanismos de ação diferentes em doses adequadas. Há duas áreas de interesse nesse contexto: a ancestralidade genética que, a princípio, poderia impactar em controles pressóricos, e a farmacometabolômica que, conceitualmente, é um conjunto de mudanças em concentrações de metabólitos – um novo campo que pode esclarecer mecanismos de variações de respostas farmacológicas. Assim, nossos principais objetivos foram: associar mensurações séricas de fármacos anti-hipertensivos e seus metabólitos às respostas farmacoterapêuticas em pacientes hipertensos e analisar a ancestralidade genética em pacientes hipertensos a fim de verificar uma possível associação com as respostas farmacoterapêuticas e a hipertensão resistente. **Métodos:** Foram utilizadas amostras de 1.597 pacientes, sendo 187 HR. A preparação e a análise da amostra foram realizadas usando uma coluna com nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs) em um sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (UPLC-MS/MS), em modo *column switching*. A ancestralidade genética foi realizada usando um painel de 192 marcadores polimórficos; três referências foram usadas (europeia, ameríndia e africana). A raça foi determinada pela autodeclaração, segundo IBGE (branco, pardo, negro e outros). **Resultados:** O método foi totalmente validado de acordo com as diretrizes da *Food and Drug Administration* (FDA). O tempo de execução total para cada análise foi de 12,0 min – incluindo a preparação da amostra. Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de cada analito de acordo com pacientes responsivos e não responsivos, possivelmente, por causa do número de amostra ainda baixo (n total de 171 amostras). As médias das mensurações no grupo dos respondedores foram: clonidina 1,308µg/L; amlodipina 44,044µg/L; enalapril 67,706µg/L; enalaprilato 44,144µg/L; losartana 202,622µg/L; ácido carboxílico de losartana 65,99µg/L, glicuronídeo N-2 de losartana 43,4µg/L e espironolactona 85,87µg/L. Para o grupo dos não respondedores, obtivemos: clonidina 1,4µg/L; amlodipina 78,89µg/L; enalapril 87,821µg/L; enalaprilato 78,878µg/L; losartana 148,026µg/L, ácido carboxílico de losartana 83,535µg/L, glicuronídeo N-2 de losartana 122,452µg/L e espironolactona 79,72µg/L. A raça autodeclarada foi associada aos componentes da ancestralidade genética desses pacientes ($p < 0,001$). A ancestralidade genética, disponível para 1.503 pacientes, teve média geral de 0,53, para europeia; 0,11, para ameríndia; e 0,35, para africana. Não foram encontradas diferenças estatísticas nas médias de ancestralidade de acordo com os grupos respondedor ou HR. **Conclusões:** O método analítico foi validado e a ancestralidade genética foi realizada, ambos não associados à farmacoterapêutica e à hipertensão resistente.

Descritores: hipertensão; genética humana; doenças cardiovasculares; anti-hipertensivos; química analítica; grupos de populações continentais.

Abstract

Bueno CT. *Pharmacometabolomic and genetic ancestry evaluations in hypertensive patients from a randomized clinical trial* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Background: Resistant hypertensive (RH) patients are individuals with uncontrolled blood pressure - despite treatment with one diuretic and two antihypertensives with different mechanisms of action in adequate doses. There are two areas of interest in this context: genetic ancestry that could initially impact on blood pressure controls, and pharmacometabolomics, which conceptually is a set of changes in metabolite concentrations - a new field that can clarify mechanisms of pharmacological response variation. Thus, our main objectives were: to associate serum measurements of antihypertensive drugs and their metabolites to the pharmacotherapeutic responses in hypertensive patients and to analyze genetic ancestry in hypertensive patients in order to verify a possible association with pharmacotherapeutic responses and resistant hypertension. **Methods:** Samples of 1,597 patients were used, being 187 RH. Sample preparation and analysis were performed using a column with restricted access carbon nanotubes (RACNTs) in a liquid chromatography coupled to mass spectrometer (UPLC-MS/MS) in column switching mode. Genetic ancestry was performed using a panel of 192 polymorphic markers; three references were used (European, Amerindian and African). The race was determined by self-declaration, according to IBGE (white, brown, black and others). **Results:** The method has been fully validated according to the guidelines of the Food and Drug Administration (FDA). The total run time for each analysis was 12.0 min including sample preparation. No significant differences were found in the concentrations of each analyte according to responsive and nonresponsive patients, possibly because of the still low number of samples (total n of 171 samples). The means of the measurements in the responders group were: clonidine 1.308µg/L; amlodipine 44.044µg/L; enalapril 67.706µg/L; enalaprilat 44.144µg/L; losartan 202.622µg/L; losartan carboxylic acid 65.99µg/L, N-2 glucuronide of losartan 43.4µg/L and spironolactone 85.87µg/L. For the group of non-responders, we obtained: clonidine 1.4 µg/L; amlodipine 78.89µg/L; enalapril 87.821µg/L; enalaprilat 78.878µg/L; losartana 148.026µg/L, losartan carboxylic acid 83.535µg/L, N-2 glucanide of losartan 122.452µg/L and spironolactone 79.72µg/L. Self-reported race was associated with the components of the genetic ancestry of these patients ($p < 0.001$). Genetic ancestry, available for 1,503 patients, had an overall mean of 0.53 for European; 0.11 for Amerindian; and 0.35 for African. No statistical differences were found in the means of ancestry according to responder or RH groups. **Conclusion:** The analytical method was validated and genetic ancestry was performed, both unrelated to pharmacotherapeutic and resistant hypertension.

Descriptors: hypertension; human genetics; cardiovascular diseases; antihypertensive agents; chemistry, analytic; continental population groups.

1. Introdução

O conjunto das doenças cardiovasculares (DCV) pode ser representado por hipertensão arterial (HA), aterosclerose coronária, doença cerebrovascular, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita e suas complicações, constituindo, assim, a maior causa de morte precoce na idade adulta, com 17 milhões de mortes em 2017, segundo a lista das principais causas de mortalidade publicada pela Organização Mundial de Saúde. Metade dos homens e um terço das mulheres com 40 anos de idade, sem queixas cardiovasculares, apresentam alguma manifestação da doença arterial coronariana, como angina de peito, insuficiência coronária, infarto do miocárdio ou morte pela doença ¹. Deste modo, há necessidade de inovações e pesquisas no tratamento farmacológico desses pacientes. A aplicação farmacológica é uma das bases do tratamento das doenças cardiovasculares e esta, nas últimas décadas, foi uma das grandes responsáveis pelas reduções na morbidade e mortalidade.

1.1 Hipertensão Arterial

A HA é uma condição clínica multifatorial que está associada tanto a fatores genéticos quanto ambientais e exibe alta estimativa de herdabilidade, que varia de 20% a 60%². Representa uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade, sendo a terceira mais frequente causa de invalidez ³. As prevalências globais de hipertensão em indivíduos com 18 anos ou mais foram estimadas em 24,1% para homens e 20,1% para mulheres, em 2015 ⁴. No Brasil, 21,4% da população com idade >18 anos relatou história de HA na Pesquisa Nacional de Saúde de 2013 ⁵. Esta condição afeta mais de nove milhões de pessoas no mundo ⁶.

Um em cada quatro adultos é hipertenso; acredita-se que o número de adultos com hipertensão em 2025 tenha aumento de 60%, atingindo mais de 1,5 bilhão de pessoas ². No Brasil, a prevalência de hipertensos é de mais de um terço da população adulta ⁷. Dessa forma, mais de 36 milhões de adultos teriam HA em nosso país, mais da metade sem saber o diagnóstico e, grande parte, sem controle adequado e com maior risco de complicações ⁸.

A HA pode ser definida como aumento significativo na pressão sanguínea, geralmente apresentando valores de pressão diastólica ≥ 90 mmHg e/ou de pressão sistólica ≥ 140 mmHg. Pressão sanguínea refere-se à pressão exercida pelo sangue circulante nas paredes dos vasos e é principalmente determinada por débito cardíaco e resistência periférica total ⁹. É comumente medida de forma não invasiva por esfigmomanômetro. A pressão arterial (PA) de um indivíduo é expressa em termos da pressão máxima (sistólica) e da mínima (diastólica) por batimento cardíaco e esses valores são reportados em milímetros de mercúrio (mmHg). A HA é mais comum em homens do que em mulheres (pelo menos até a menopausa), em pessoas com ancestralidade africana, sendo que a prevalência aumenta com a idade.

A primeira avaliação a ser feita da pressão arterial deve ser obtida de ambos os braços; pelo menos três medidas devem ser realizadas, com intervalo de um minuto entre elas. A média das duas últimas será considerada a medida real. As pressões sistólicas e/ou diastólicas obtidas não podem apresentar diferença maior do que 4 mmHg, enquanto a diferença entre os membros superiores não podem ser maiores do que 20x10 mmHg para as pressões sistólica/diastólica, respectivamente. Caso isso ocorra, o indivíduo

deverá ser investigado para doenças arteriais e, nesses casos, deve-se utilizar como referência sempre o braço com o maior valor para as próximas medidas¹⁰.

A utilização da MAPA (monitorização ambulatorial da pressão arterial de 24 horas) e da MRPA (monitorização residencial da pressão arterial) é importante na investigação de pacientes com suspeita de HA. Recomenda-se, sempre que possível, a medida da PA fora do consultório, para esclarecimento do diagnóstico, identificação da hipertensão do avental branco (HAB) e da hipertensão mascarada (HM)¹⁰. De acordo com a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão, existem 5 tipos de hipertensão: a hipertensão arterial verdadeira, a normotensão verdadeira, a hipertensão sistólica isolada (HSI), a HAB e a HM⁹.

Considera-se normotensão verdadeira se as medidas de consultório são consideradas normais. Deve-se considerar as médias de pressão na MRPA ou, ainda, no período de vigília pela MAPA $<130 \times 85$ mmHg¹¹. Já a HSI é definida como comportamento anormal da PA sistólica com PA diastólica normal, ou seja, PA sistólica >140 mmHg e PA diastólica <90 mmHg, sendo a forma mais prevalente de elevação da pressão arterial em pacientes acima de 50 anos de idade¹².

Define-se HAB quando o paciente apresenta medidas de PA persistentemente elevadas ($\geq 140 \times 90$ mmHg) no consultório e médias de PA consideradas normais seja na residência, pelo MRPA, ou pela MAPA^{10, 13}. Até 70% dos pacientes com esse comportamento de PA terão HA pela MAPA e/ou MRPA em um período de dez anos^{14, 15}. Por fim, a HM é definida como a

situação clínica caracterizada por valores normais de PA no consultório (< 140/90 mmHg), porém com PA alterada pela MAPA durante o período de vigília ou na MRPA ¹⁶. A mesma deve ser pesquisada em indivíduos com PA normal ou limítrofe e também nos hipertensos controlados, com sinais de lesões em órgãos-alvo, histórico familiar positivo para HA, risco cardiovascular alto e medida casual fora do consultório anormal ^{10, 17}.

1.2 Hipertensão Resistente

Os chamados hipertensos resistentes (HR), para os quais se estima prevalência em torno de 12% ¹⁸, podem ser caracterizados por manterem níveis de PA que permanecem elevados, apesar do uso de três ou mais anti-hipertensivos em doses adequadas, incluindo-se preferencialmente um diurético, ou em uso de quatro ou mais medicamentos com controle pressórico ^{19, 20}.

A prevalência de HR vem crescendo nas últimas décadas, podendo ser explicada pela epidemia de sobrepeso/obesidade e também pela alteração introduzida nas Diretrizes de Hipertensão de 2017, que passou a estabelecer os critérios de corte para diagnóstico da HR com níveis de PA menores do que 130×80 mmHg ²¹.

Alguns fatores que implicam na HR são: nível basal da pressão, obesidade, consumo excessivo de sódio, presença de hipertrofia de ventrículo esquerdo, etnia africana, presença de diabetes mellitus e de doença renal crônica ^{22, 23}. Referente à fisiopatologia, hiperativação simpática e do sistema renina-angiotensina, proliferação da musculatura lisa vascular, retenção de

sódio e ativação de fatores pró-inflamatórios podem ser fatores relacionados à HR, além de maior disfunção endotelial e rigidez arterial ^{22, 24}.

1.3 Tratamentos da Hipertensão

O tratamento da HA consiste no uso de medicamentos anti-hipertensivos associados a modificações do estilo de vida (redução do peso, redução do consumo de sódio, realização de atividades físicas, etc).

Em relação à HR, o tratamento ideal inicia-se com a associação de anti-hipertensivos que bloqueiem a maioria dos mecanismos fisiopatológicos de elevação da PA, sendo idealmente um diurético, um bloqueador do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e um bloqueador de canal de cálcio (BCC) em doses adequadas.

1.3.1 Diuréticos

O mecanismo de ação dos diuréticos pode ser descrito pela produção e excreção de urina, com diminuição do volume extracelular. Após cerca de quatro a seis semanas, o volume circulante praticamente se normaliza e há redução da resistência vascular periférica diminuindo, assim, a PA ^{23, 25, 26}. Esta classe de medicamentos pode ser dividida em três principais tipos com base em seus locais de ação: os diuréticos de alça, os poupadores de potássio e os tiazídicos.

Os diuréticos de alça são mais utilizados em situações de hipertensão associada à insuficiência renal com baixa taxa de filtração glomerular e na insuficiência cardíaca com retenção de volume. Os diuréticos poupadores de potássio apresentam pequena eficácia diurética, mas, quando associados aos

tiazídicos e aos diuréticos de alça, são úteis na prevenção e no tratamento de hipocalcémias. Por fim, os diuréticos tiazídicos são menos potentes que os diuréticos de alça, mas são os mais indicados para tratar a hipertensão. São mais tolerados do que os diuréticos de alça e, em ensaios clínicos, demonstram reduzir os riscos de acidentes vasculares cerebrais (AVC) e de infarto do miocárdio associados à hipertensão. Os medicamentos mais utilizados de acordo com o tipo do diurético são: para diuréticos de alça, a furosemida; para diuréticos poupadores de potássio, a espironolactona e para tiazídicos, a clortalidona.

1.3.2 Inibidores Adrenérgicos de Ação Central

Atuam estimulando os receptores alfa-2 adrenérgicos pré-sinápticos no sistema nervoso central, reduzindo o tônus simpático. O efeito hipotensor como monoterapia é, em geral, discreto. Entretanto, podem ser úteis em associação com medicamentos de outros grupos, particularmente quando há evidência de hiperatividade simpática. Um exemplo desta classe de medicamentos é a clonidina, porém a mesma necessita de amplo acompanhamento, pois pode ocorrer hipertensão de rebote, caso o medicamento seja suspenso bruscamente.

1.3.3 Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina

Agem fundamentalmente pela inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueando a transformação da angiotensina I em II no sangue e nos tecidos. São potentes vasoconstritores e estimuladores da aldosterona. Os inibidores da ECA agem também na redução da degradação

da bradicinina, que é uma proteína vasodilatadora, e, conseqüentemente, têm sua ação aumentada ^{22, 27}. Os inibidores da ECA podem ser classificados em três grupos, baseados em sua estrutura química. Um que contém radical sulfidril formado basicamente pelo captopril; um segundo que contém radical carboxil, formado pela maioria dos compostos (enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril e outros); e um terceiro que contém um radical fósforo (fosinopril). Quando administrados em longo prazo, os inibidores da ECA retardam o declínio da função renal em pacientes com nefropatia diabética ou de outras etiologias ²⁸.

1.3.4 Antagonistas dos Receptores da Angiotensina II

Os inibidores da ECA possuem muitas características em comum com outra classe de medicamentos, os chamados antagonistas dos receptores da angiotensina II (ARA), que são usados frequentemente quando os pacientes são intolerantes aos efeitos adversos produzidos por inibidores da ECA ou são não respondedores. Inibidores da ECA não impedem completamente a formação de angiotensina II, uma vez que existem outros caminhos de conversão. Assim, os ARA podem ser úteis por impedir a ação da angiotensina II no receptor AT1, deixando o receptor AT2 desbloqueado. A terapia de combinação de ARA com inibidores da ECA pode ser superior à terapia isolada ²⁹⁻³¹. Um exemplo de medicamentos de uso frequente desta classe é a losartana.

1.3.5 Bloqueadores dos Canais de Cálcio

Os agentes bloqueadores de canais de cálcio são classificados em relação à estrutura química: fenilalquilaminas (galopamil e tiapamil), diidropiridinas (nifedipina, nisoldipia, felodipina e amlodipina) e benzotiazepinas (diltiazem) ³². Possuem afinidade pelos canais de cálcio do tipo L no músculo liso vascular e no cardíaco, onde acarretam menor influxo de cálcio e vasoconstrição e dilatação da musculatura coronariana. São atualmente fármacos de primeira escolha no tratamento da HA devido à eficácia e à melhor tolerância pelos pacientes em comparação com outros fármacos, sendo uma alternativa no tratamento de pacientes idosos. Não causam retenção de sódio e não comprometem a função renal ³³.

1.4 Estudos Farmacometabolômicos

A metabolômica é a área que analisa um sistema biológico através da mensuração do conjunto de metabólitos produzidos e/ou modificados no interior de uma célula, um tecido ou um fluido. Longe de ser uma avaliação focada em um número limitado de reações enzimáticas ou em um único mecanismo, esta rastreia toda complexidade de uma rede de metabólitos ³⁴. Já a farmacometabolômica pode ser entendida como o conjunto das alterações no metaboloma, advindas de tratamentos farmacológicos, e sua abordagem pode esclarecer mecanismos para variações das respostas ao tratamento, ou ainda, entender como as alterações genéticas influenciam nas respostas. Num contexto de tratamento personalizado, a metabolômica pode investigar a presença de biomarcadores relacionados a aspectos farmacocinéticos e

farmacodinâmicos do fármaco os quais expressem a efetividade do tratamento, o mecanismo de ação, a toxicidade ou a ocorrência de efeitos adversos ³⁵⁻³⁸.

Estudos farmacometabolômicos ainda são escassos na literatura. Por isso, alguns estudos não específicos para HA serão explanados abaixo, porém, com desenhos experimentais compatíveis com nossos objetivos.

Estudos metabolômicos relacionados à sinvastatina demonstraram uma ampla variedade de efeitos metabólicos diretamente envolvidos no metabolismo do colesterol que podem contribuir na eficácia da redução do risco de DCV, além dos efeitos pleiotrópicos e dos riscos de eventos adversos. Além disso, os achados apontaram interações importantes envolvendo o metaboloma, o genoma e o microbioma que podem ser as bases interindividuais para as diferenças na resposta de estatinas ³⁹. Perfis metabólicos basais dos bons e maus respondedores foram analisados de modo a determinar os metabólitos que melhor separavam os dois grupos de resposta e de modo a ter resposta preditiva ao LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol). Entre estas estavam xantina, ácido 2-hidroxi-butírico, ácido succínico, ácido esteárico e frutose. Juntos, os resultados desse estudo indicam que grupos de metabólitos envolvidos em múltiplas vias, não diretamente ligados com o metabolismo do colesterol, podem desempenhar um papel na modulação da resposta ao tratamento com sinvastatina ⁴⁰.

Outro estudo nesta área demonstrou uma diferença nos metabólitos do atenolol segundo as etnias. Um conjunto de dados indicou que as alterações induzidas pelo atenolol no metaboloma são dependentes de raça e de

genótipo, representando assim um primeiro passo de uma abordagem farmacometabolômica para o fenótipo de pacientes com hipertensão ⁴¹.

Outro estudo metabolômico relata alterações bioquímicas no soro de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 pós-tratamento com metformina. Mostrando que a metformina possui uma função importante na inibição da gliconeogênese hepática, na regulação lipídica e diminuiu o estresse oxidativo provocado pela hiperglicemia e dislipidemia. Esses resultados foram importantes para a melhor compreensão do mecanismo de ação da metformina ³⁵.

A avaliação do perfil metabolômico na pesquisa de biomarcadores de efeitos farmacológicos da rosiglitazona utilizou grupos de voluntários saudáveis e pacientes com diabetes mellitus tratados com rosiglitazona ou placebo. Através deste estudo, foram identificadas alterações em aminoácidos relacionados a mudanças na sensibilidade hepática à insulina. Além disso, evidenciaram-se diferenças bioquímicas entre gênero, idade e estágios da doença ³⁸.

1.5 Estudos de Ancestralidade Genética

Atualmente, importantes discussões sobre ancestralidade genética (AG) e sua relação com predisposições de doenças e respostas a medicamentos são recorrentes na literatura ⁴²⁻⁴⁵. A HA é uma delas, sendo a causa predominante das DCV. Quando se trata de HR, estes pacientes apresentam risco ainda maior de complicações cardiovasculares, maiores riscos de morbidade e mortalidade – o que ressalta a importância da identificação

precoce e, possivelmente, da prevenção da HR ⁴⁶⁻⁴⁸. Uma das possíveis causas já discutidas para esta predisposição é a etnia africana ⁴⁹⁻⁵⁴.

A HR é a pressão arterial não controlada, apesar do tratamento com três ou mais medicamentos anti-hipertensivos, incluindo, se tolerado, um diurético em doses adequadas ^{53, 54}. Pacientes com HR apresentam risco ainda maior de complicações cardiovasculares ⁴⁸ e estima-se que 10-20% das pessoas com hipertensão são resistentes, ressaltando a importância de compreender os determinantes da doença ⁵⁵⁻⁵⁷.

No Brasil, a raça/etnia autodeclarada é baseada em uma complexa avaliação fenotípica e cultural subjetiva, porque a população brasileira é altamente miscigenada com as principais populações contribuintes ancestrais sendo europeia, africana e ameríndia ^{58, 59}.

Marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) são ferramentas importantes para diferenciar populações e estimar proporções de ancestralidade. Essas análises são baseadas em polimorfismos genéticos cujas frequências alélicas variam acentuadamente em diferentes grupos raciais/étnicos e são tipicamente usadas para controlar resultados incorretos de estratificações e análises por raça ⁶⁰. A implementação desse tipo de método com painéis de AIMs, com genótipos de alta produtividade, facilitaria o mapeamento simultâneo de características de doenças complexas ⁶¹.

2. Objetivos

- 1- Associar mensurações séricas de fármacos anti-hipertensivos e seus metabólitos às respostas farmacoterapêuticas em pacientes hipertensos.
- 2- Analisar a ancestralidade genética em pacientes hipertensos, a fim de verificar uma possível associação com as respostas farmacoterapêuticas e a hipertensão resistente.

3. Materiais e métodos

3.1 Casuística

As amostras deste projeto provêm de um estudo prospectivo denominado *Resistant Hypertension Optimal Treatment Trial* - ReHOT ¹⁸, que foi finalizado em 2014 e contou com a participação de 25 centros localizados em diferentes estados do Brasil.

O projeto teve como objetivo selecionar uma coorte secundária de hipertensos, sendo estes os hipertensos resistentes. Para ser classificado como hipertenso resistente, primeiramente foram excluídos os casos de hipertensão secundária e, então, foram classificados apenas os pacientes que não tiveram a pressão arterial controlada ($\geq 140 \times 90$ mmHg), apesar do uso de três ou mais anti-hipertensivos com diferentes mecanismos de ação, em doses adequadas, incluindo um diurético.

Foram incluídos neste estudo pacientes com pressão arterial sistólica ≥ 160 mmHg e ≤ 220 mmHg na posição sentada.

Foram excluídos pacientes com pressão arterial sistólica > 220 mmHg, com eventos cardiovasculares (AVC, IAM etc.) ou procedimentos cardiovasculares com menos de seis meses de evolução, com insuficiência renal estágios IV e V, insuficiência cardíaca CF III e IV, com história de doença maligna com expectativa de vida < 2 anos, etilismo, com doenças psiquiátricas que impeçam o cumprimento do protocolo, mulheres em idade fértil que não estejam em uso de método contraceptivo eficaz, gravidez, arritmias graves, valvopatias, bloqueio AV 2º e 3º graus sem MP, com hepatopatias graves e pacientes com história de hipersensibilidade a algum dos medicamentos previstos no estudo.

Os 25 centros que participam do estudo ReHOT foram:

Região Sudeste. 14 Centros Participantes: HCFMUSP - Instituto do Coração - Prof. Dr. Eduardo Moacyr Krieger; HCFMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - Prof. Dr. Décio Mion Jr.; UNIFESP - FOR - Fundação Oswaldo Ramos - Prof. Dr. Marcelo da Costa Batista; UNIFESP - Disciplina de Cardiologia - Prof. Dr. Antônio Carlos de Camargo Carvalho; IDPC - Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Prof. Dr. Celso Amodeo; USP/HCRP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Prof. Dr. Fernando Nobre; UNICAMP - Faculdade de Ciências Médicas - Prof. Dr. Heitor Moreno Jr.; UNESP/Botucatu - Faculdade de Medicina de Botucatu - Prof. Dr. Roberto Jorge da Silva Franco; HUAP - Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense - Prof. Dr. Antônio Claudio Lucas da Nóbrega; UFRJ - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Prof. Dr. Armando da Rocha Nogueira; UERJ I - Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Profa. Dra. Maria Eliane Campos Magalhães; UFES - Universidade Federal do Espírito Santo - Prof. Dr. José Geraldo Mill; UFMG - Hospital das Clínicas da Universidade de Minas Gerais - Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro; UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto - Prof. Dr. Raimundo Marques do Nascimento.

Região Sul. 03 Centros Participantes: HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Prof. Dr. Flávio Danni Fuchs; IC-FUC - Fundação Universitária de Cardiologia - Prof. Dr. Iran Castro; PUC RS - Hospital São Lucas Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - Prof. Dr. Luís Carlos Bodanese.

Região Nordeste. 06 Centros Participantes: HAN - Hospital Ana Nery da Universidade Federal da Bahia - Prof. Dr. Armênio Costa Guimarães; HSI - Hospital Santa Izabel da Santa Casa de Misericórdia - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - Prof. Dr. Gilson Soares Feitosa; UFC - Universidade Federal do Ceará - Prof. Dr. Carlos Roberto Martins Rodrigues Sobrinho; UFPE - Universidade Federal de Pernambuco - Prof. Dr. Hilton Chaves; UFS - Universidade Federal de Sergipe - Prof. Dr. José Augusto Soares Barreto Filho; UNICSAL - Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - Profa Dra. Maria do Carmo Borges Teixeira.

Região Norte. 01 Centro Participante: UFPA (Universidade Federal do Pará) – Hospital Universitário João de Barros Barreto - Prof. Dr. Eduardo Augusto da Silva Costa).

Região Centro Oeste. 01 Centro Participante: UFG - Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás - Prof. Dr. Paulo César Brandão Veiga Jardim.

3.2 Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto desta pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo SDC: 0758/09). Os indivíduos foram informados do estudo e incluídos quando consentiram em participar, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.3 Delineamento do Estudo ReHOT

1ª FASE: Estabelecer uma coorte secundária de pacientes hipertensos para uma padronização de associação de anti-hipertensivos para o tratamento e controle da hipertensão arterial e identificação de pacientes resistentes: o intervalo entre todas as visitas do estudo foi de 4 semanas (28 dias), com tolerância de +/- 5 dias.

VISITA 0: Foram incluídos cerca de 2.000 pacientes com pressão arterial maior ou igual a 160x100 mmHg e menor que 220 mmHg que, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, passaram por exame físico, responderam questionários de entrada e iniciaram o tratamento medicamentoso com a associação de clortalidona 25 mg/dia e enalapril 20 mg 2x/dia. Para pacientes com intolerância aos inibidores de ECA, o enalapril 20 mg 2x/dia foi substituído por losartana 50 mg 2x/dia.

VISITA 1: Após quatro semanas de seguimento, foi feito o acompanhamento e esses pacientes foram submetidos a avaliações de rotina preconizadas pelas V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, dosagem de Na⁺ plasmático e hemograma. Além desses exames, ecocardiograma bidimensional (quando havia disponibilidade no centro participante) e MAPA. Foi feita, ainda, uma caracterização fenotípica especial para determinar avaliação dos fenótipos de predomínio de aumento de atividade do SRA ou simpático: dosagem de renina e aldosterona plasmáticas e da excreção de Na⁺ e K⁺ urinários nas 24 horas e registro de eletrocardiograma por 20 minutos, em repouso, para posterior análise espectral do sinal. Também foi realizada coleta de sangue para organização de sorogenotecas e coleta de sangue para organização de

biotecas desta coorte secundária, somente dos pacientes que formalmente autorizaram a coleta e o armazenamento – através do termo de consentimento livre e esclarecido. Se, nesta visita, a pressão arterial permaneceu acima de 140x90 mmHg, acrescentou-se amlodipina 5 mg/dia, podendo ter sido titulado até 10 mg/dia na visita subsequente. Se houvesse aparecimento de efeito colateral com enalapril (tosse ou farmacodermia), o mesmo poderia ser trocado por losartana 50 mg 2x/dia.

VISITA 2: Após seguimento de mais quatro semanas, foi feito o acompanhamento dos pacientes. Em relação ao ajuste de medicamento, conforme citado anteriormente, se a pressão arterial permanecesse acima de 140x90 mmHg, o amlodipina 5 mg/dia poderia ser titulado até 10 mg/dia. Se houvesse aparecimento de efeito colateral com enalapril (tosse ou farmacodermia), o mesmo poderia ser trocado por losartana 50 mg 2x/dia.

VISITA 3: Randomização: após o seguimento de mais quatro semanas, todos os pacientes foram submetidos a acompanhamento, questionários de seguimento, nova MAPA, avaliação de rotina (com exceção da análise de urina) e dosagem de Na⁺ plasmático e hemograma. Os pacientes que mantiveram pressão arterial de consultório igual ou acima de 140x90 mmHg e pressão arterial de 24 horas na MAPA igual ou acima de 130x80 mmHg foram considerados hipertensos resistentes, os quais passaram para a segunda fase do estudo clínico.

VISITAS 4 e 5: Os pacientes controlados passaram por duas visitas de assistência farmacêutica (visita 4 e visita 5) a cada 4 semanas.

VISITA 6: Pacientes controlados: assim, doze semanas após a visita 3, os pacientes com pressão arterial controlada (<140x90 mmHg ou com PA de 24 h na MAPA <130x80 mmHg) passaram por acompanhamento, questionários de seguimento, MAPA, avaliação de rotina, Na⁺ plasmático, hemograma, ecocardiograma bidimensional (se havia disponibilidade no centro participante) e ECG (20 minutos), para avaliação do controle da pressão arterial, da função renal, metabolismo lipídico e glicídico. Também foi realizada nova coleta de sangue para organização de biotecas.

2ª FASE: Os hipertensos resistentes foram aleatoriamente divididos em 2 grupos:

VISITAS 4 e 5: Pacientes resistentes: os hipertensos resistentes ao esquema proposto foram tratados aleatoriamente com clonidina ou espironolactona. Houve o acompanhamento a cada 4 semanas com titulação progressiva da clonidina (0,100 mg 2x/dia, 0,200 mg 2x/dia até 0,300 mg 2xdia) ou da espironolactona (12,5 mg 1x/dia, 25 mg 1x/dia até 50 mg 1x/dia).

VISITA 6: Pacientes resistentes: passaram por acompanhamento, questionário de seguimento, MAPA, avaliação de rotina, dosagem de Na⁺ plasmático, hemograma, ecocardiograma bidimensional (se havia disponibilidade no centro participante) e ECG (20 minutos), para avaliação de controle da pressão arterial, função renal, metabolismo lipídico e glicídico e para nova coleta de sangue para organização de biotecas; comparando-se com o grupo de pacientes com a pressão arterial controlada na primeira fase.

Após 24 semanas de seguimento do estudo, formaram-se grupos de pacientes controlados com 2 ou 3 medicamentos, controlados com 4 medicamentos e não controlados.

3.4 Análises Farmacometabolômicas

A análise farmacometabolômica deste projeto foi desenvolvida para a determinação e a quantificação de seis fármacos anti-hipertensivos, das diferentes classes farmacológicas citadas acima e alguns dos seus metabólitos (quando disponível) em soro humano. As amostras não tratadas foram analisadas diretamente em um sistema de comutação de colunas (*column switching*) usando uma coluna de extração contendo nanotubos de carbono de acesso restrito (RACNTs) em cromatografia líquida de *ultraperformance* acoplada a um espectrômetro de massa (UPLC-MS/MS).

3.4.1 Preparo dos Nanotubos de Carbono de Acesso Restrito (RACNTs)

Os nanotubos de carbono (CNTs) foram revestidos com albumina de soro bovina (BSA) para transformá-los em materiais de acesso restrito. Este processo foi feito de acordo com Barbosa et al.⁶².

Descrição do método:

1. 500 mg de CNT foram adicionados em um cartucho de extração de fase sólida (SPE);
2. acoplou-se este cartucho a um sistema a vácuo do tipo Manifold;
3. aproximadamente 20 mL de BSA 1% (m/v) preparado em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH igual a 6,0) foram percolados através do cartucho contendo os CNTs a um fluxo de aproximadamente 1,0 mL min⁻¹;

4. 5 mL de solução aquosa de glutaraldeído 25% (m/v) foram percolados lentamente pelo cartucho, garantindo que todo material estivesse em contato com o glutaraldeído;
5. fechou-se a válvula do Manifold, deixando o sistema em repouso por aproximadamente 5 horas;
6. após período de repouso, 10 mL de solução aquosa de boro-hidreto de sódio 1% (m/v) foram percolados através dos CNTs em um fluxo de aproximadamente 1 mL min^{-1}
7. o material foi lavado exaustivamente com água (pH=7,0) para se eliminarem possíveis resíduos da preparação dos RACNTs.

Após o término do preparo dos RACNTs, eles foram colocados dentro de uma coluna que, posteriormente, foi empregada no preparo de amostra *online* no sistema cromatográfico. Na Figura 1, está demonstrada a coluna utilizada para a análise.

Fonte: Autor.

Figura 1. Foto ilustrativa da coluna utilizada.

A coluna encontra-se fechada e aberta e pode-se notar, ao centro, a presença do cartucho onde são colocados os RACNTs.

3.4.2 Caracterização dos RACNTs

Para confirmação de que os CNTs de fato tornaram-se RACNTs, foram necessários testes de comproatórios, inicialmente de capacidade de exclusão de proteínas, nos quais utilizou-se uma solução aquosa de BSA 44 mg mL^{-1} (concentração aproximada de proteínas presentes no soro humano), que foi injetada ($500 \text{ }\mu\text{L}$) no sistema cromatográfico sem a presença da coluna RACNT, inicialmente, com o detector UV operando no comprimento de onda 255 nm , usando tampão fosfato ($\text{pH} = 7,0$) como fase móvel e uma vazão de 1 mL min^{-1} . O sinal obtido nessa análise foi corresponde a 100% do BSA injetado. Posteriormente, uma coluna contendo aproximadamente 30 mg do RACNT foi acoplada no sistema e a mesma solução de BSA foi injetada, tendo, nesta segunda análise, a área do pico obtido dividida pela área do sinal de 100% de BSA correspondente à porcentagem de BSA eluída, ou seja, excluída pelos RACNTs.

Ademais, foram necessários, também, estudos de cinética e adsorção para a confirmação dos RACNTs nos quais utilizaram-se 10 mg de CNTs ou RACNTs a 25°C , mais 5 mL de solução de um dos analitos numa concentração de 50 mg L^{-1} que foram colocados em tubos de polipropileno, agitados durante tempos diferentes a 75g , sendo, após, imediatamente centrifugados a 699g por 10 minutos . As concentrações dos analitos nos sobrenadantes foram analisadas pelo sistema cromatográfico. Desta forma, foi possível verificar o tempo necessário para que se adquira o equilíbrio entre o analito adsorvido/presente no sobrenadante, ou seja, aferindo a capacidade adsortiva do material tanto para o CNT quanto para o RACNT. Após obter o tempo

necessário para atingir o equilíbrio, foram feitas as isotermas de adsorção. Neste teste, 10 mg de CNTs ou RACNTs foram colocados em tubos de polipropileno contendo solução padrão em concentrações distintas de um mesmo analito; em seguida, os tubos foram agitados pelo tempo obtido no teste de cinética a 75g e imediatamente centrifugados a 699g. As concentrações dos analitos nos sobrenadantes foram posteriormente analisadas pelo sistema cromatográfico.

3.4.3 Equipamentos Utilizados

- UPLC Shimadzu® (Kyoto, Japão);
- Espectrômetro de massas LCMS-8030 Shimadzu® (Kyoto, Japão);
- Coluna analítica Shim-pack XR-ODS C18 Shimadzu® (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Kyoto, Japão);
- Aquisição dos dados foi fornecida pelo *software*: LCSolutions®.

3.4.4 Reagentes e Soluções

Os solventes utilizados nas fases móveis foram:

- Metanol (Merck®, Darmstadt, Alemanha);
- Acetonitrilo (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha);
- Álcool isopropílico (Dinâmica®, Diadema, Brasil);
- Ácido fórmico (Biotec®, Pinhais, Brasil);
- Hidróxido de amônio (Isofar®, Jacareí, Brasil).

Foram utilizadas na síntese das RACNTs:

- Albumina de soro bovina;
- Glutaraldeído (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha);

- Boro-hidreto de sódio (Nuclear®, Diadema, Brasil).

As soluções padrões utilizadas no desenvolvimento da metodologia foram inicialmente preparadas para uma solução de reserva com uma concentração de 1 mg mL⁻¹ por dissolução de cada composto em metanol. Após a preparação, estas soluções padrões foram armazenadas em frascos âmbar a -20°C. As soluções de trabalho obtidas a partir da solução de estoque foram preparadas diariamente.

Padrões utilizados:

- Clortalidona - CTD (Santa Cruz Biotechnology®);
- Enalapril - ELP(Santa Cruz Biotechnology®);
- Enaprilato - ENT (Santa Cruz Biotechnology®);
- Amlodipina - AML (Santa Cruz Biotechnology®);
- Cloridrato de clonidina - CND (Tocris Bioscience®);
- Espironolactona - SPL (Acros Organics®);
- 7- α -tiometil-espironolactona - 7SP (Santa Cruz Biotechnology®);
- Losartana - LOS (Santa Cruz Biotechnology®);
- Ácido carboxílico de losartana - LCA (Santa Cruz Biotechnology®);
- Glicuronídeo N-2 de losartana – N2G (Santa Cruz Biotechnology®);
- Padrões Internos (PIs): Losartana-d4 - LOS-d4 e Cloridrato de Clonidina-d4 - CND-d4 (TRC®, Toronto, Canadá).

3.4.5 Parâmetros Analíticos

Condições utilizadas no espectrômetro de massas:

- Fonte de ionização: ESI (electrospray ionization);

- Modo de ionização: positivo;
- Temperatura da DL (desolvation line): 250 °C;
- Temperatura do heat block: 400 °C;
- Fluxo de gás nebulizador: 2,0 L min⁻¹;
- Fluxo de gás secante: 15,0 L min⁻¹;

Condições cromatográficas utilizadas no UPLC:

- Coluna analítica Shim-pack XR-ODS C18 Shimadzu® (150 mm x 4,6 mm, 5 µm);
- Fase de carregamento (bomba A): tampão formiato de amônio 0,01 mol L⁻¹ (pH 5,0);
- Fase de limpeza (bomba B): acetonitrila:álcool isopropílico: água ultrapura (75:15:10)
- Fase móvel (bomba C): metanol: tampão formiato de amônio 0,01 mol L⁻¹ (pH = 5,0)
- Volume de amostra: 100 µL;
- Temperatura do forno: 70 °C;
- Detector UV (SPD-10AVP): λ = 255 nm (monitorar exclusão *online* de proteínas);
- Tempo total de análise: 12 minutos;

As transições de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) de cada analito, bem como as energias de colisões empregadas a partir da otimização do espectrômetro de massas, estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Analitos e seus respectivos precursores, bem como fragmentos e energia de colisão otimizada.

Analito	Precursor (m/z)	Fragmentos (m/z)	Energia de colisão (kV)
Ácido carboxílico de losartana	437,2	235,1*	- 20
		180	- 30
		207	- 25
Amlodipina	409	238*	- 10
		294,05	- 10
		206	- 25
Clonidina	230	44*	- 50
		213	- 25
		172	- 30
Clortalidona	320,90	176,95	- 40
		240	- 25
		212,10	- 30
Enalapril	377,40	234*	- 20
		303	- 15
		160,10	- 30
Enalaprilato	349,10	206,10*	- 20
		160	- 30
		303	- 10
Espironolactona	341,20	107*	- 35
		91,90	- 50
		187	- 20
Losartana	423,20	207,10*	- 20
		405,10	- 10
		377,15	- 15
Glicuronídeo N-2 de losartana	600	192*	- 50
		554,15	- 20
		207	- 40
7- α -tiometil-espironolactona	391,10	149,05	- 20
		113,15	- 10
		167	- 15
Losartana-d4 (PI)	427	211,05*	- 25
		409,15	- 10
		381,15	- 15
Clonidina-d4 (PI)	233,90	48*	- 50
		217	- 25
		172	- 35

* Fragmentos quantificados.

3.4.6 Configuração do Sistema Column Switching

O sistema de comutação de colunas foi realizado no modo *backflush*, como pode ser visto na Figura 2. O sistema consistiu em uma bomba A que carregava a fase de carregamento (BA) contendo tampão formiato de amônio

0,01 mol L⁻¹ (pH = 5,0); uma bomba B que carregava a fase de limpeza (BB) contendo acetonitrila: álcool isopropílico: água ultrapura (75:15:10, v:v:v) e uma bomba C que carregava a fase móvel (BC) contendo metanol: tampão formiato de amônio 0,01 mol L⁻¹ (pH = 5,0) (90:10, v:v).

Ambas as bombas (A e B) foram conectadas a um autoamostrador equipado com uma válvula de injeção automática com um *loop* de 100 µL.

Antes de iniciar as análises, a coluna RACNTs foi condicionada com a fase de carregamento A, a um fluxo de 0,4 mL min⁻¹, enquanto a coluna analítica foi simultaneamente condicionada pela fase móvel C a 0,4 mL min⁻¹ (posição da válvula 1) (Figura 2A).

No passo de carregamento (de 0 a 2,0 min), 100 µL de amostra/solução de padrão interno foram injetados e a fase de carregamento A foi conduzida através da coluna RACNTs para reter os analitos e excluir os interferentes (como proteínas). Depois disso, a válvula de seis portas foi trocada para a posição 2 e o passo de eluição foi iniciado (Figura 2B). Nesta etapa (de 2,0 a 2,5 min), a fase móvel C foi responsável por eluir os analitos da coluna RACNTs para a coluna analítica em um fluxo oposto ao aplicado na fase de carregamento (*backflush*) em um fluxo de 1 mL min⁻¹. Em seguida, a válvula foi trocada novamente, retornando à posição inicial 1, onde foi mantida até o final da análise.

De 2,5 a 4,5 min, houve diminuição linear na concentração da fase de carregamento (de 100 a 0%) e aumento na concentração da fase de limpeza (de 0 a 100%), que passou pela coluna RACNTs, começando, assim, o passo

de limpeza. Nesta etapa, a taxa de fluxo inicial foi aumentada linearmente de 0,4 para 1,5 mL min⁻¹ (de 4,5 a 6,0 min). Esta taxa de fluxo manteve-se até 9,0 min, quando a composição da fase móvel voltou a ser 100% da fase de carregamento A e a taxa de fluxo retornou para 0,4 mL min⁻¹ para recondicionar a coluna para o próximo ciclo. Simultaneamente ao passo de limpeza, os analitos, que anteriormente foram direcionados para a coluna analítica, foram eluídos pela fase móvel C, em direção ao espectrômetro de massa, para serem analisados. Este passo (de 2,5 a 9,0 min) foi realizado à taxa de fluxo constante de 0,4 mL min⁻¹.

Para garantir o recondicionamento do sistema, de 9,0 para 12,0 min, a fase de carregamento A e a fase móvel C foram enviadas às colunas RACNTs e analítica, respectivamente, com taxa de fluxo de 0,4 mL min⁻¹. O tempo total de cada análise foi de 12 minutos, incluindo a preparação da amostra e a análise cromatográfica.

Fonte: Autor.

Figura 2. Sistema *column switching* em configuração *backflush* empregando a coluna RACNT.

Sistema de comutação de coluna na configuração *backflush* com coluna RACNTs. O sistema cromatográfico é composto por três bombas A (BA), B (BB) e C (BC), um transmissor automático, uma válvula automatizada de seis orifícios (posição 1 e 2), colunas RACNTs e analítica, detector (UV), resíduos (R) e espectrômetro de massa (EM). Na posição 1, o circuito é preenchido com amostra, os analitos são retidos e as proteínas são excluídas. Depois disso, na posição 2, os compostos são eluídos da coluna RACNTs para a via analítica, onde são separados na coluna analítica e depois enviados para o EM para ser analisado.

Fonte: Autor

3.4.7 Amostras Analisadas

As amostras de soro foram mantidas à temperatura de -80°C e descongeladas apenas para serem analisadas. O soro foi submetido à diluição de 1:4 em água (v:v) e injetado diretamente no sistema.

Foram analisadas 171 amostras provenientes do protocolo ReHOT mencionado anteriormente (esquema abaixo). Estas amostras foram primeiramente separadas em 2 grupos de acordo com o quadro de hipertensão resistente ou não. Posteriormente, estas amostras foram subdivididas em responsivas ou não, no fim das 24 semanas de acompanhamento.

3.5 Análises de Ancestralidade

Foram utilizadas lâminas customizadas para análise de 192 AIMs em uma plataforma de genotipagem disponível comercialmente da Applied Biosystems™ para o equipamento QuantStudio™ 12K Flex. Essa plataforma utiliza o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, uma

técnica que permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma precisa e rápida. A genotipagem foi feita por meio de um *chip* de genotipagem, ou seja, uma lâmina que contém os moldes para cada um dos marcadores dispostos em nanopozos agrupados em *arrays*, de forma que cada lâmina possui *arrays* suficientes para obter os 192 genótipos de 15 indivíduos ao mesmo tempo, contando com uma reação de controle negativo para avaliar a qualidade da genotipagem. Todo o processo de genotipagem no equipamento ocorre internamente e, ao final do processo, obtemos os genótipos para cada indivíduo.

A escolha destes 192 AIMS para estas análises de ancestralidade foi feita baseando-se em um artigo publicado do nosso grupo, no qual Santos H.C e colaboradores identificaram este painel, baseado em uma análise inicial de mais de 370mil SNPs, para chegarem, após, a uma forte afirmação de que esses 192 AIMS poderiam ser utilizados para caracterização de conjuntos amostrais de populações miscigenados. Os marcadores se mostraram aptos a identificar e/ou quantificar a ancestralidade de indivíduos da América Latina ou de populações estadunidenses de origem hispânico-latina ⁶³.

3.5.1 Técnica de OpenArray™

Esta tecnologia usa uma placa do tamanho de uma lâmina de microscópio com 3.072 furos. Cada placa contém 48 *subarrays*, cada um com 64 buracos de passagem. Cada furo é de 300 µm de diâmetro e 300 µm de profundidade, sendo revestido por materiais hidrofílicos e hidrofóbicos. Os reagentes são retidos nos furos de passagem através da tensão superficial

(Figura 3). Cada placa de OpenArray analisava, por vez, 15 amostras diferentes, necessitando de 3 *subarrays* para cada uma delas.

Disponível em:

<<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/images/technical-reference-library/large-images/openarray-fig1-data.jpg>>. Acessado em: Agosto de 2018.

Figura 3. Chip de OpenArray da Applied Biosystems™.

Estes *chips* ajudam a facilitar as análises de PCR em tempo real (RT-PCR), pois possibilitam a análise de grande número de amostras, simultaneamente. O RT-PCR é uma técnica que possibilita o monitoramento da PCR à medida que ela ocorre, em tempo real no sistema. Os dados são, portanto, coletados ao longo do processo de PCR, as reações são caracterizadas pelo tempo durante o ciclo, no qual, a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez, em vez da quantidade de alvo acumulado após

um número fixo de ciclos. Quanto maior o número de cópias iniciais do alvo de ácido nucleico, mais cedo se observa o aumento significativo na fluorescência. Esta técnica está demonstrada na Figura 4 e será descrita abaixo.

Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>>. Acessado em: Agosto de 2018.

Figura 4. Processo do ensaio de genotipagem por RT- PCR da Applied Biosystems™.

- 1- Inicialmente, o DNA genômico é introduzido em uma mistura de reação composta por TaqMan® Master Mix (reagente, da própria empresa, capaz de condicionar a reação), primers *forward* e *reverse* e duas sondas;
- 2- Cada sonda emparelha-se especificamente com uma sequência complementar, se presente, entre os primers, *forward* e *reverse*. Quando

a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* supressor ao *quencher* repórter suprime a fluorescência do repórter.

- 3- A atividade da exonuclease da DNA Polimerase cliva apenas sondas hibridadas com o alvo. A clivagem separa o *quencher* repórter do *quencher* supressor, aumentando a fluorescência pelo repórter. O aumento da fluorescência ocorre apenas se a sequência alvo amplificada for complementar à sonda. Assim, o sinal de fluorescência gerado pela amplificação por PCR indica quais alelos estão na amostra.

3.5.2 Amostras Analisadas

Foram analisadas 1.503 amostras provenientes do protocolo ReHOT. Estas amostras inicialmente foram extraídas a partir dos leucócitos presentes nas amostras dos pacientes, utilizando uma técnica de precipitação salina, e armazenadas em freezer - 80°C.

Antes de seguirem para as análises de OpenArray, estas amostras passaram por uma seleção de qualidade de pureza. Neste momento, foi detectado grande grau de impureza nas amostras, fazendo com que necessitassem passar por um processo de purificação para atingir maior pureza. A purificação foi realizada com o kit comercial PureLink® Purification Kit - Qiagen®. No final do processo de purificação, apenas amostras que atingiram a razão de pureza entre 1,78 e 2,10 permaneceram no estudo de ancestralidade, sendo então padronizadas na concentração 50 ng mL⁻¹, para, posteriormente, iniciarem as análises.

O volume total da reação foi de 5 µL, contendo 2,5 µL de Master Mix, para análises em tempo real de OpenArray, e 2,5 µL de DNA com

concentração de 50 ng μL^{-1} . As condições de temperatura foram de 10 min a 93 °C; 50 ciclos de 45s a 93 °C, 13s a 94 °C e 2,14 min a 53,5 °C; seguido de incubação a 25 °C durante 2 min. A análise de dados foi realizada usando o pacote de *software* TaqMan Genotyper Software v.1.3.

3.5.2 Metodologia Estatística para as Análises de Ancestralidade

A análise de ancestralidade global foi realizada utilizando o programa Admixture ⁶⁴. Admixture é uma ferramenta para estimativa de máxima verossimilhança de ancestrais individuais de conjuntos de dados de genótipos SNP multilocus. Ele usa o mesmo modelo estatístico como estrutura, mas calcula estimativas muito mais rapidamente, usando um algoritmo de otimização numérica rápida. Este programa usa uma abordagem de relaxamento de blocos para atualizar alternadamente parâmetros de frequência de alelos e frações de ascendência. Cada atualização de bloco é tratada pela resolução de grande número de problemas de otimização convexos independentes, que são abordados usando um algoritmo de programação quadrática sequencial rápida. A convergência do algoritmo é acelerada usando um novo método de aceleração quase-Newton.

Para preparar os dados a serem analisados por este programa, foi utilizado o programa estatístico R (versão 3.0.0) ⁶⁵. Toda a manipulação do banco de dados genotípico foi feita pelo programa Plink ⁶⁶. O teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher foi usado para comparar as variáveis categóricas. O teste T, Mann-Whitney, Anova e Kruskal-Wallis foram usados para determinar as diferenças entre as médias das variáveis numéricas e o p valor considerado como significativo foi <0,05.

4. Resultados

Foram incluídos 1.924 pacientes. O número total de pacientes em cada visita do estudo, o número de desistências e seus respectivos motivos estão descritos na Figura 5.

Ref. Figura retirada do artigo de Krieger E.M. et al. *Spironolactone Versus Clonidine as a Fourth-Drug Therapy for Resistant Hypertension*. *Hypertension*. 2018;71:00-00⁶⁷.

Figura 5. Número de pacientes incluídos e perdas de seguimento de pacientes do estudo ReHOT.

As informações clínicas e demográficas dos pacientes do ReHOT estão descritas na Tabela 2. Estas informações mostraram que houve diferença significativa, entre os pacientes resistentes e não resistentes, nos valores de pressão arterial sistólica/diastólica, no número de pacientes que já sofreram acidente vascular cerebral e no número de pacientes com diabetes mellitus.

Tabela 2. Características clínicas e demográficas entre pacientes resistentes e não resistentes do estudo ReHOT.

Medidas	Total (n = 1597)	Não resistente (n=1410)	Resistente (n=187)	p valor
Pressão arterial sistólica (At) (mm Hg)	172,5±15,7	171,4±15,1	180,6±17,5	<0,001 ¹
Pressão arterial diastólica (mm Hg)	102,4±11,6	101,9±11,3	106,1±13,4	<0,001 ¹
Índice de Massa Corporal (kg/m ²)	30,8 ± 6,4	30,8 ± 6,5	30,7±5,1	0,903 ¹
Idade (anos)	54±10	54±10	55±11	0,141 ¹
Sexo Masculino (%)	40,5	39,8	45,5	0,16 ²
Raça (branco %)	41,6	42	39	0,49 ²
Índice de massa corporal na V3 (kg/m ²)	30,7 ± 11,8	30,6 ± 12,5	31 ± 6,2	0,663 ¹
Diabetes mellitus (%)	18,7	16,9	32,6	<0,001 ²
Dislipidemia (%)	29,2	28,4	35,8	0,043 ²
Insuficiência cardíaca (%)	0,6	0,6	0,5	1 ²
Acidente vascular cerebral (%)	3,8	3	10,2	<0,001 ²
Infarto do miocárdio (%)	1,1	0,9	2,1	0,252 ²

Dados reportados como média ± desvio padrão

(1) Teste *t-student*

(2) Teste independente de Qui-square

A diferença significativa verificada, entre a pressão arterial dos pacientes resistentes e dos não resistentes, se manteve significativa mesmo quando estratificada entre os diferentes períodos de mensuração, 24 horas, acordado e dormindo (Tabela 3).

Tabela 3. Diferenças na pressão arterial em diferentes tempos de mensuração dos pacientes resistentes e dos não resistentes do estudo ReHOT.

Medidas em mm Hg	Total (n = 1597)	Não resistente (n=1410)	Resistente (n=187)	p valor ¹
Pressão arterial sistólica (24h)	122,6 ± 18,9	119,8 ± 17,9	142,5 ± 13,1	<0,001
Pressão arterial diastólica (24h)	74,9 ± 12,3	73,4 ± 11,8	86,2 ± 9,8	<0,001
Pressão arterial sistólica (Acordado)	125,3 ± 19,5	122,6 ± 18,6	145,2 ± 12,9	<0,001
Pressão arterial diastólica (Acordado)	77,8 ± 12,8	76,2 ± 12,3	89,2 ± 10,6	<0,001
Pressão arterial sistólica (Dormindo)	115,3 ± 21,8	112,6 ± 20,9	135,3 ± 17,4	<0,001
Pressão arterial diastólica (Dormindo)	68 ± 13,8	66,5 ± 13,5	79,4 ± 9,8	<0,001

Dados reportados como média ± desvio padrão
(1) Teste *t-student*

4.1 Resultados Farmacometabólicos

4.1.1 Otimização do Método Analítico

Primeiramente, foi realizada a otimização dos parâmetros adotados no espectrômetro de massas para cada analito. Para essa finalidade, foram injetados 30 µL de solução padrão 1µg mL⁻¹ em fluxo de 0,4 mL min⁻¹ diretamente no espectrômetro de massas.

Um *scan* em modo positivo (modo de ionização adotado para todos os analitos) foi realizado para verificar a presença de íon precursor e demais fragmentos provenientes de sua fragmentação, monitorando sempre suas relações massa/carga (*m/z*). Na ionização gerada por eletrospray no modo positivo, geralmente o íon precursor apresenta relação *m/z* igual à massa molecular do analito acrescido de 1 unidade, por conta de uma protonação.

Após fazer o *scan* e constatar a presença do íon precursor, realizou-se o SIM (*Selected Ion Monitoring*) para monitorar apenas os íons precursores de cada analito. Em etapa subsequente, foi realizada a otimização, que foi

desenvolvida pelo *software* LCSolutions®. Nesta etapa, foram realizados ajustes do íon precursor, determinação dos 3 principais fragmentos por MRM provenientes dele (maior abundância) e, por fim, foram realizados ajustes para determinar as melhores energias de colisão de cada transição monitorada.

Ao finalizar todos os passos anteriormente descritos, para verificar a resposta dos analitos perante o método parcialmente otimizado, as amostras de soro foram dopadas com concentrações variando de 10 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, submetidas à análise pelo método desenvolvido. As concentrações trabalhadas foram em três níveis distintos: baixas, médias e altas, para cada um dos analitos (ELP, ENT, CND, SPL, LOS, LCA, N2G e AML). Para os PIs: CND-d4 e LOS-d4, as concentrações trabalhadas foram de 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

As variáveis avaliadas foram: composição e fluxo de fases móveis (fases de eluição, carga e limpeza), tempos de exclusão e eluição, temperatura do forno, fator de diluição da amostra e composição da coluna de extração (número de fritas e quantidade de RACNTs). As condições iniciais foram 3,0 min do tempo de extração; 1,0 min do tempo de eluição; tampão de formiato de amônio 5 mM (pH = 4,0) como a fase de carga a uma taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹; metanol: tampão de formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ (pH = 4,0) (60:40, v: v) como a fase de eluição a uma taxa de fluxo de 0,6 mL min⁻¹; metanol puro como fase de limpeza; injeção de 100 μL do soro não diluído e do forno de coluna a 22 °C.

Os primeiros parâmetros avaliados foram a composição e a taxa de fluxo da fase de eluição. Esses parâmetros são responsáveis pela eluição dos

analitos que foram retidos na coluna RACNTs no passo de carregamento, além de influenciarem a ionização dos analitos na fonte de eletropulverização. O metanol ou o acetonitrilo em combinação com tampão de formiato de amônio ou tampão de acetato de amônio em diferentes pHs (de 3 a 8) e proporções diferentes (de 0 a 100%) foram testados, bem como as concentrações de tampão variando de 5 a 20 mmol L⁻¹. Os LODs e LOQs inferiores foram alcançados utilizando a fase móvel composta de metanol: tampão de formiato de amônio 10 mmol L⁻¹ (pH=5,0) (90:10, v: v). Portanto, esta fase foi escolhida como fase de eluição. A taxa de fluxo da fase de eluição foi testada de 0,2 a 0,6 mL min⁻¹, e as maiores sensibilidades foram obtidas para taxas de fluxo de 0,3 e 0,4 mL min⁻¹. No entanto, o segundo foi escolhido devido ao aumento da frequência analítica. As melhores condições para a composição da fase de eluição foram adquiridas provavelmente devido ao aumento da ionização dos analitos na fonte.

O equilíbrio na composição da fase de carregamento é importante porque é responsável tanto pela adsorção de analitos como pela exclusão de proteínas. Nestes testes, foram avaliados o tampão de formiato de amônio e o tampão de acetato de amônio em pHs variando de 4,7 a 8,0 e em diferentes concentrações variando de 5 a 20 mmol L⁻¹. Os melhores resultados para ambos os propósitos foram obtidos usando-se o tampão de formiato de amônio 10 mmol L⁻¹ (pH = 5,0) como fase de carregamento. O pH da fase de eluição deve ser maior que o ponto isoelétrico de albumina sérica (aproximadamente 4,9) ⁶⁸, mas as soluções com pH superiores a 5,0 causaram a perda de analitos pelo carregamento. Isso provavelmente deve-se à diminuição da interação

entre os analitos e RACNTs e o aumento de afinidade para a fase aquosa, tornando-se os analitos mais polares.

A limpeza da coluna RACNTs é necessária para evitar o efeito residual (*carry-over*), o efeito da matriz e garantir a limpeza total da coluna. Em primeiro lugar, a acetonitrila pura ou o metanol em água em diferentes proporções (de 0 a 100%), bem como combinados com ácido acético ou hidróxido de amônio – ambos à concentração de 0,2% (v: v) foram testados. Os efeitos sobre a matriz foram observados usando todas essas soluções. Portanto, avaliou-se o teor de acetonitrila: álcool isopropílico: água ultrapura (75:15:10, v: v), tendo em vista o bom desempenho na limpeza dos RACNTs.

De acordo com a literatura ⁶⁹, foram obtidos bons resultados com a última solução testada, podendo fornecer completamente a limpeza da coluna, evitando os efeitos residuais e matriciais.

A otimização da temperatura do forno, na qual colunas analíticas e de extração foram colocadas, também foi realizada. Temperaturas variando de 22 a 80 °C foram testadas, sendo que a melhoria na detectabilidade pôde ser notada nos níveis mais altos, a partir de 70 °C em diante. Porém, os melhores resultados em relação à detectabilidade foram obtidos a 70 °C, provavelmente por proporcionarem equilíbrio ideal entre a capacidade de retenção dos RACNTs e a capacidade de eluição dos analitos. Assim, a temperatura de 70 °C foi escolhida como condição de trabalho.

As diluições de amostras em série na água foram testadas de 1:1 a 1:5 (v:v) (sempre usando 100 µL de amostra) para garantir a limpeza do sistema

por longo período de tempo, trabalhando em condições que diminuam a probabilidade de danos ao equipamento e aumentando a vida útil da coluna RACNTs, além de ter a possibilidade de usar menor volume de amostra. A diluição 1:4 (v:v) proporcionou boa detecção, obtendo-se LODs e LOQs adequados para as análises propostas. Ademais, o pequeno volume de soro na amostra (20% de soro e 80% de água) aumentou a duração da coluna em cerca de 10 vezes, além de ter evitado danos no sistema. Diluições superiores a 1:4 (v:v) promoveram diminuição considerável na detectabilidade, sendo inviável seu uso. Deste modo, a diluição 1:4 (v:v) foi escolhida como condição ótima.

Para avaliar o tempo de exclusão da proteína pela coluna RACNTs, a válvula de comutação foi mantida na posição 1 (Figura 2A) e foram injetados 100 µL de amostra de soro diluída (1:4, v:v) no sistema e eluídos pela fase de carregamento a 0,4 mL de fluxo de min^{-1} através da coluna RACNTs. O sinal obtido pelo detector UV, operando a 255 nm, acoplado ao sistema LC, foi monitorado e, como pode ser visto na Figura 6, 2,0 min foram suficientes para excluir as proteínas. Portanto, esse tempo foi escolhido como condição de trabalho.

Figura 6. Sinal obtido pelo detector UV acoplado ao sistema LC.

O método desenvolvido foi capaz de determinar vários compostos simultaneamente, embora apresentassem propriedades físico-químicas diferentes, como, por exemplo, pKas e, portanto, diferentes polaridades (os fármacos inalterados geralmente são menos polares do que seus respectivos metabólitos). Devido a essas diferenças, foi muito difícil alcançar uma condição ideal de análise para todos os analitos. Nesta tentativa de encontrar condições ideais, alguns analitos acabaram perdendo a viabilidade de serem analisados de forma válida em nosso método.

Os resultados apresentados pelos analitos 7 α -tiometil espironolactona e clortalidona foram de difícil interpretação, a monitorização dos fragmentos por MRM desses analitos foi dificultada pelo fato de que os perfis apresentados pelos cromatogramas não eram reprodutíveis. Desta forma, estes dois analitos não passaram nos critérios de validação do método e tiveram que ser excluídos das análises.

4.1.2 Síntese e Caracterização de RACNTs

Os RACNTs foram previamente desenvolvidos pelo nosso grupo de colaboradores da Universidade Federal de Alfenas, encapsulando os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) com uma camada BSA^{62, 69-71}, sendo esta modificação confirmada por microscopia eletrônica de transmissão e espectrometria de raios-X dispersiva de energia^{62, 70}. A eficiência dos RACNTs na realização da função RAM (capacidade de exclusão de proteína) está diretamente relacionada à presença da camada externa BSA. O revestimento BSA funciona como barreira física e química. No papel de barreira física, os RACNTs fornecem acesso aos compostos de baixo peso molecular através dos poros da rede de polímeros BSA, enquanto as macromoléculas, particularmente as proteínas, são excluídas⁶². A barreira química também está relacionada à camada BSA e pode ser explicada por fenômeno de repulsão eletrostática, que ocorre entre as proteínas da camada BSA e as proteínas da amostra quando o pH médio, neste caso, é maior do que o ponto isoelétrico (IP) das proteínas (da amostra e da camada BSA). Neste caso, ambas as proteínas presentes na amostra e a camada de BSA permanecem em estado ionizado, promovendo a exclusão das proteínas e a adsorção dos analitos no núcleo da CNTs dos RACNTs⁷².

A capacidade dos RACNTs utilizados neste presente método, na exclusão das proteínas do soro, foi testada conforme descrito na Figura 7, sendo que as áreas de pico obtidas no sistema com e sem a coluna RACNTs foram muito similares apesar dos diferentes perfis. Assim, é possível concluir que a capacidade de exclusão dos RACNTs foi de aproximadamente 100%.

Figura 7. Sinais analíticos obtidos a partir da injeção de 100 μL da solução padrão BSA 44 mg mL^{-1} sem (A) e com (B) a coluna RACNTs.

4.1.3 Validação Analítica

Os testes de validação realizados neste método foram: linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão, precisão, seletividade, estabilidade dos analitos, recuperação de extração, efeito residual e efeito matricial. O método foi validado de acordo com as Diretrizes da *United States Food and Drug Administration* (FDA, 2013).

Um conjunto de amostras de soro humano branco ($n = 10$) foi utilizado nos testes de validação, enriquecidas com ELP, ENT, CND, SPL, LOS, LCA, N2G e AML em diferentes concentrações, variando de 0,4 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os padrões internos deuterados da clonidina (CND-d4) e do losartan (LOS-d4) foram utilizados nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A linearidade foi realizada utilizando o conjunto de analitos nas seguintes concentrações para cada analito: ELP: 20; 100; 200; 350 e 500 μg de

L⁻¹; ENT: 20; 50; 100; 150 e 200 µg L⁻¹; CND: 0,4; 1; 2; 3 e 5 µg L⁻¹; SPL: 40; 100; 150; 200 e 250 µg L⁻¹; LOS: 30; 100; 200; 250 e 350 µg L⁻¹ LCA: 50; 100; 200; 250 e 350 µg L⁻¹; N2G: 60; 100; 200; 250 e 350 µg L⁻¹; E AML: 0,6; 2; 5; 10; 20 µg L⁻¹. Os intervalos lineares foram baseados em seus respectivos intervalos terapêuticos ⁷³⁻⁸⁰. Foram realizadas seis repetições para cada analito e, com isso, foram obtidas seis curvas de calibração. A linearidade foi expressa como o coeficiente de determinação (r²), calculado a partir das curvas de calibração intraensaio.

Os LODs e LOQs foram calculados a partir das seis curvas de calibração obtidas usando o soro na mesma concentração do ensaio de linearidade. Os LODs e LOQs foram definidos como 3 a 10 vezes entre a relação sinal/ruído, respectivamente.

Os intra e inter-ensaios relacionados à precisão e exatidão foram realizados com o menor (ELP e ENT, 20 µg L⁻¹, CND, 0,4 µg L⁻¹, SPL, 40 µg L⁻¹, LOS, 30 µg L⁻¹, LCA, 50 µg L⁻¹, N2G, 60 µg L⁻¹ e AML, 0,6 µg L⁻¹), médio (ELP, LOS, LCA e N2G, 200 µg L⁻¹; ENT, 100 µg L⁻¹, CND, 2 µg L⁻¹, SPL, 150 µg L⁻¹ e AML, 5 µg L⁻¹) e mais alto (ELP 500 µg L⁻¹, ENT, 200 µg L⁻¹, CND, 5 µg L⁻¹, SPL, 250 µg L⁻¹, LOS, LCA e N2G de 350 µg L⁻¹ e AML, 20 µg L⁻¹) níveis de calibração em seis repetições. As análises intraensaio foram realizadas no mesmo dia e os testes inter-ensaio foram realizados em três dias diferentes. A precisão foi calculada pelo desvio padrão relativo (RSD%) e a precisão foi determinada pelo erro relativo (E%).

A seletividade do método foi realizada avaliando-se a presença de picos interferentes nos mesmos tempos de retenção dos analitos e PIs. Este

teste foi realizado utilizando um conjunto de amostras de soro humano branco (n = 10).

A estabilidade foi avaliada de acordo com os procedimentos para as amostras que foram submetidas. Para este efeito, foram realizadas as estabilidades de bancada, longo prazo, congelamento e descongelamento. As soluções de estoque recentemente fabricadas foram preparadas em três níveis de expansão (menor, médio e mais alto) e foram analisados em triplicada. No teste de estabilidade do banco (curto prazo), a amostra de soro foi imediatamente analisada após o processamento e depois analisada novamente após 4 e 24 horas. A estabilidade em longo prazo foi determinada após o armazenamento da amostra de soro durante 30 dias a -20 °C. As estatísticas de congelamento e descongelamento também foram avaliadas. A amostra de soro foi submetida a três ciclos de congelamento a -20 °C e descongelamento à temperatura ambiente e analisada no final do processo.

A recuperação de extração foi avaliada pela recuperação relativa (ou aparente) em três níveis de dopagem diferentes (menor, médio e mais alto) em triplicada. Este ensaio relacionou a quantidade de analitos e dos PIs extraídos de uma matriz (soro) após a extração passando pelo processo de comutação da colunas com a quantidades extraídas de uma solução aquosa submetida ao mesmo procedimento analítico. Este parâmetro foi expresso pela relação entre a concentração encontrada na análise da matriz por meio daquela obtida na análise da solução aquosa.

O *carry-over* (efeito residual) foi avaliado pela injeção de uma amostra de soro branco antes da introdução de uma amostra com o nível de calibração

mais elevado e outro soro em branco após a injeção desta amostra dopada. As áreas de pico obtidas no tempo de retenção dos analitos do soro branco injetado após o soro dopado foram inferiores a 20% daqueles alcançados no LOQ.

O teste do efeito da matriz pode ser relacionado à supressão ou ao aprimoramento iônico. Para realizar o ensaio do efeito da matriz, as soluções aquosas com cada anti-hipertensivo nos níveis mais baixo, médio e mais alto foram analisadas pelo método validado (n=6). Em seguida, seis soros em branco (4 normais, 1 lipêmico e 1 hemolizado) com os mesmos níveis de concentração sofreram o mesmo processo descrito anteriormente. Os resultados obtidos, em ambos os casos, foram comparados e um E% inferior a 15% foi adotado como critério aceito.

O método foi linear para todos os analitos, determinados em suas respectivas faixas analíticas com $r^2 \geq 0,99$. Os LODs e LOQs variaram de 0,09 a 10,85 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,3 a 36,17 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (os resultados obtidos das validações de parâmetros podem ser vistos na Tabela 4).

Esses valores foram baixos quando comparados com os encontrados na literatura, fato que pode ser confirmado na Tabela 5, analisando-se os valores obtidos em métodos nos quais foram determinados, simultaneamente, o máximo de 3 analitos, iguais aos determinados no método proposto. Vale ressaltar que o intervalo analítico proposto para este método estava relacionado à faixa terapêutica esperada dos medicamentos determinados.

Tabela 4. Parâmetros de validação obtidos na determinação dos fármacos anti-hipertensivos em soro humano.

Parâmetros de validação	ELP	ENT	CND	SPL	LOS	LCA	N2G	AML
Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	20-500	20-200	0,4-5,0	40-250	30-350	50-350	60-350	0,6-20
r^2 ($\bar{x}$, n=6)	0,9964	0,9991	0,9994	0,9916	0,9905	0,9996	0,9993	0,9959
Declínio (α) ($\bar{x}$, n=6)	0,007	0,0008	0,0007	0,0021	0,0037	0,0003	0,0002	0,0092
Intercepto ($\bar{x}$, n=6)	0,1455	0,002	0,027	-0,0064	0,1406	0,0034	0,0002	-0,007
Tempo de Retenção (min)	6,13	5,59	5,79	6,63	5,90	5,58	5,83	6,24
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,10	4,67	0,09	4,67	4,28	4,97	10,85	0,12
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10,33	15,58	0,30	15,57	14,26	16,57	36,17	0,41
Precisão Intra-ensaio RSD%	6,44 ^a	8,00 ^a	13,47 ^a	8,36 ^a	7,48 ^a	8,09 ^a	13,97 ^a	6,91 ^a
($\bar{x}$, n=6)	7,47 ^b	6,98 ^b	6,20 ^b	9,05 ^b	6,87 ^b	10,48 ^b	2,21 ^b	8,10 ^b
	5,30 ^c	9,95 ^c	7,66 ^c	3,27 ^c	4,45 ^c	7,66 ^c	2,05 ^c	4,35 ^c
Precisão Inter-ensaio RSD%	4,50 ^a	5,16 ^a	10,86 ^a	7,32 ^a	6,34 ^a	1,17 ^a	3,44 ^a	12,36 ^a
($\bar{x}$, n=18, três dias)	5,60 ^b	1,06 ^b	1,66 ^b	3,12 ^b	3,03 ^b	1,96 ^b	5,64 ^b	1,63 ^b
	2,07 ^c	2,28 ^c	0,98 ^c	0,47 ^c	2,01 ^c	8,91 ^c	6,56 ^c	6,72 ^c
Exatidão Inter-ensaio E%	-5,99 ^a	0,28 ^a	-8,70 ^a	12,89 ^a	2,72 ^a	11,48 ^a	10,02 ^a	3,11 ^a
($\bar{x}$, n=18, três dias)	-0,11 ^b	-6,93 ^b	2,71 ^b	-3,37 ^b	-1,77 ^b	-3,33 ^b	-3,49 ^b	-1,16 ^b

	-1,05 ^c	-8,71 ^c	-0,17 ^c	4,32 ^c	-0,35 ^c	3,13 ^c	2,92 ^c	-0,55 ^c
Recuperação da extração %	111,71 ^a	98,51 ^a	87,80 ^a	97,98 ^a	112,41 ^a	93,85 ^a	88,41 ^a	100,4 ^a
($\bar{x}$, n=3)	88,15 ^b	91,91 ^b	99,49 ^b	104,26 ^b	94,88 ^b	102,32 ^b	97,37 ^b	100,1 ^b
	93,72 ^c	93,99 ^c	101,59 ^c	101,30 ^c	100,82 ^c	98,14 ^c	93,02 ^c	100,7 ^c
Estabilidade¹ E% ($\bar{x}$, n=6)	-7,42 ^a	-11,37 ^a	11,96 ^a	-0,82 ^a	-2,42 ^a	-1,39 ^a	-0,83 ^a	13,49 ^a
	0,63 ^b	-3,95 ^b	-2,32 ^b	-11,11 ^b	-10,25 ^b	-0,37 ^b	-3,08 ^b	-3,07 ^b
	1,73 ^c	-6,58 ^c	-5,60 ^c	6,05 ^c	-8,86 ^c	-5,35 ^c	9,11 ^c	3,72 ^c
Estabilidade² E% ($\bar{x}$, n=6)	-12,64 ^a	1,44 ^a	5,42 ^a	11,01 ^a	10,45 ^a	-10,40 ^a	-9,03 ^a	6,54 ^a
	-5,51 ^b	5,79 ^b	-6,11 ^b	-8,58 ^b	-8,47 ^b	-6,19 ^b	-10,93 ^b	-5,29 ^b
	-7,15 ^c	-11,11 ^c	-5,33 ^c	2,66 ^c	-7,21 ^c	-10,67 ^c	2,39 ^c	-0,77 ^c
Estabilidade³ E% ($\bar{x}$, n=6)	-3,00 ^a	-8,72 ^a	-3,31 ^a	6,59 ^a	-4,70 ^a	-1,49 ^a	-9,22 ^a	6,01 ^a
	-4,29 ^b	-8,83 ^b	6,64 ^b	-183 ^b	3,55 ^b	10,34 ^b	-8,00 ^b	8,55 ^b
	-7,37 ^c	-2,11 ^c	5,46 ^c	-6,04 ^c	-3,87 ^c	8,63 ^c	-9,31 ^c	10,93 ^c
*Efeito de Matriz	11,68 ^a	-1,48 ^a	-12,19 ^a	-2,14 ^a	13,30 ^a	-6,14 ^a	-11,51 ^a	1,80 ^a
E% ($\bar{x}$, n=6)	-11,89 ^b	-8,09 ^b	-0,50 ^b	4,43 ^b	-5,10 ^b	2,35 ^b	-2,63 ^b	0,39 ^b
	-6,27 ^c	-6,00 ^c	1,59 ^c	1,43 ^c	0,82 ^c	-1,85 ^c	-6,97 ^c	0,85 ^c

^abaixo, ^bmédio e ^calto níveis de calibração.

¹Estabilidade de bancada (de 4 a 24 horas).

²Estabilidade a longo prazo (após 30 dias de congelamento).

³Estabilidade de congelamento e descongelamento (após 3 ciclos de congelamento e descongelamento).

Precisão: RSD% = [desvio padrão/média] x 100.

E% = [(média de concentração experimental / concentração nominal) x 100] – 100.

*Efeito de matriz E%: [(média de concentração experimental em solvente / média de concentração experimental em soro) x 100] – 100.

O método desenvolvido foi extremamente eficiente para extrair os analitos das amostras. Valores variando de 88,15 a 112,41% da recuperação de extração foram obtidos, como mostrado na Tabela 5. Os valores de recuperação obtidos foram iguais ou superiores aos anteriormente existentes.

A Figura 8 mostra o cromatograma do soro branco (n = 10) e as Figuras 9 e 10 o cromatograma do soro dopado nos níveis de calibração médio e alto, respectivamente. O método exibiu precisão adequadas, intra e inter-ensaios, como pode ser observado na Tabela 5. Valores abaixo de 20%, para o menor nível de calibração, e abaixo de 15%, para os níveis de calibração médio e superior em relação ao RSD%, bem como valores entre -20 e 20%, para o menor nível de calibração, e entre -15 e 15%, para os níveis de calibração médio e superior em relação ao E%, foram alcançados nestes ensaios.

Figura 8. Cromatograma do soro branco (pool n = 10). A- LOS-d4; B- CND-d4; C- ENT; D- LOS; E- LCA; F- N2G; G- SPL; H- CND; I- AML; J- ELP.

Figura 9. Cromatograma do soro dopado com o nível médio de calibração dos analitos adicionados com os padrões internos.

Figura 10. Cromatograma do soro dopado com o nível elevado de calibração dos analitos adicionados com os padrões internos.

O método revelou-se seletivo porque não houve presença de picos interferentes nos mesmos tempos de retenção dos analitos e PIs, o que pode

ser confirmado na Figura 8. Os analitos apresentaram estabilidades adequadas (bancada, longo prazo e congelamento e descongelamento) com resultados que estavam dentro de 15% das concentrações nominais (Tabela 4).

Não se observou efeito de transição após comparar as respostas analíticas obtidas por injeção das amostras de soro dopadas com o menor nível de calibração com as adquiridas por injeção das amostras de soro brancas imediatamente analisadas após as amostras de soro dopadas com nível de calibração mais elevado. Foram alcançados sinais inferiores a 20%, evidenciando a ausência de efeito residual. Os resultados do efeito matricial demonstraram que não houve supressão ou aumento iônico significativo porque o E% para todas as concentrações do nível analisado foi inferior a 15% - como mostrado na Tabela 4.

4.1.4 Resultados da Meduração Analítica

Cento e setenta e uma (n=171) amostras foram analisadas. Nosso maior objetivo foi desenvolver um método capaz de analisar, de uma única vez, todos os analitos, a fim de conseguirmos um método mais ágil e fácil de ser aplicado na prática. Este objetivo foi alcançado com sucesso. O método foi capaz de avaliar todos os diferentes medicamentos que poderiam ser utilizados pelos indivíduos analisados, nos diferentes grupos, em uma única corrida e de forma rápida e eficaz. Desta forma, este método trouxe um achado importante para a literatura, uma vez que os estudos, até este momento, eram focados em análises pontuais de analitos que fossem da mesma classe de medicamentos.

Alguns problemas foram encontrados.

O primeiro problema detectado foi um ruído muito grande, atrapalhando a leitura do analito da clortalidona, que era o único medicamento que foi utilizado de forma igual por todos os pacientes. Devido a este ruído e a falta de consistência dos resultados encontrados, foi necessário retirar a clortalidona do nosso método analítico e validar o mesmo sem a mensuração deste analito. Levando em consideração que todos os pacientes faziam uso deste medicamento, na mesma dose e pelo mesmo período de tempo, a falta deste dado não seria relevante.

Outro problema encontrado foi referente à tentativa de encontrar um método que fosse mais eficaz para uma possível prática clínica. Focando neste aspecto, obtemos um método que trabalhou com faixas analíticas de detecção de massas/cargas muito distintas. Esta faixa foi balizada de acordo com os dados da literatura, ou seja, a menor faixa de detecção e a maior faixa de detecção que havia sido descrita na literatura, para cada um destes analitos, foi coberta pelo método desenvolvido, porém, estas faixas, demonstradas na literatura, normalmente vinham de estudos que trabalharam com estes analitos de forma isolada. Desta forma, o problema encontrado, após a análise das amostras, foi que o comportamento destes limites, quando trabalhados com muitos analitos em conjunto, foi, em algumas amostras, diferente dos dados da literatura. Por conta deste novo achado, algumas mensurações ficaram fora da faixa para a qual havíamos validado nosso método e, assim, essas mensurações não foram levadas em consideração para nossas análises posteriores.

As médias das mensurações encontradas estão descritas na Tabela 5. Nesta comparação inicial, foi analisada a diferença nas mensurações entre os medicamentos e a resposta ou não ao tratamento com este medicamento.

Para esta classificação, foram considerados, como não responsivos, os indivíduos que, após as 6 visitas, obtiveram mensuração de pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg e monitorização ambulatorial de pressão arterial (MAPA) com resultados $\geq 130/80$ mmHg. Já, os pacientes considerados como responsivos, foram aqueles com resultados de pressão arterial e MAPA de $< 140/90$ mmHg e $130/80$ mmHg, consecutivamente.

Tabela 5. Mensurações da média dos analitos comparados entre os grupos de medicamentos e entre os indivíduos responsivos e não responsivos.

Mensuração dos analitos	Pacientes Responsivos	Pacientes Não Responsivos	P valor
Enalapril (N=44)	67,706	87,821	0,161
Enalaprilato (N=44)	44,144	78,878	0,713
Losartana (N=24)	202,622	148,026	0,179
Ácido carboxílico de losartana (N=37)	65,99	83,535	0,228
Glicuronídeo N-2 de losartana (N=7)	43,4	122,452	0,164
Amlodipina (N=34)	44,044	78,89	0,447
Espironolatoná (N=28)	85,87	79,725	0,869
Clonidina (N=18)	1,308	1,400	0,888

Teste de Mann-Whitney

Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias das mensurações de cada um destes analitos, quando comparados entre os grupos respondedores ou não aos diferentes tratamentos.

A Tabela 6 mostra uma nova análise comparando os grupos que fizeram uso de diferentes medicamentos, neste caso, a fim de verificar os valores de β encontrados quando comparada a mensuração de cada um dos analitos *versus* o delta de pressão arterial sistólica e diastólica, antes da intervenção medicamentosa e no fim do estudo.

Com estas análises, visamos verificar se a diminuição ou o aumento do delta desta pressão teve diferença maior e alguma correlação com um determinado medicamento.

Tabela 6. Valores de β referentes à comparação da mensuração dos analitos *versus* o delta das pressões sistólicas e diastólicas dos indivíduos que fizeram uso de enalapril e losartana.

Indivíduos Responsivos		
Delta de Pressão Arterial (V0 x V6)	Mensuração de Enalapril	Mensuração de Losartana
Sistólica	-1,691e-05	0,001
Diastólica	0,005	0,015
Indivíduos Não Responsivos		
Delta de Pressão Arterial (V0 x V6)	Mensuração de Enalapril	Mensuração de Losartana
Sistólica	0,002	0,0006
Diastólica	-0,061	-0,025
Teste de regressão linear		

Comparando os indivíduos responsivos e não responsivos que fizeram uso de enalapril e losartana, verificamos que, à medida que aumentava a mensuração dos metabolitos, aumentava também o delta da pressão sistólica. Já, para a pressão diastólica, à medida que aumenta a mensuração dos metabolitos, diminui o delta da pressão.

Porém, quando comparamos apenas os indivíduos responsivos, a associação tem um sinal contrário comparado com os indivíduos não responsivos. À medida que aumenta a mensuração do metabólito, também aumenta o delta da pressão.

Após a comparação dos indivíduos entre enalapril e losartana, comparamos também os indivíduos entre espironolactona e clonidina, como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de β referentes à comparação da mensuração dos analitos *versus* o delta das pressões sistólicas e diastólicas dos indivíduos que fizeram uso de espironolactona e clonidina.

Indivíduos Responsivos		
Delta de Pressão Arterial (V3 x V6)	Mensuração de Espironolactona	Mensuração de Clonidina
Sistólica	0,066	-28,727
Diastólica	-0,079	-23,777
Indivíduos Não Responsivos		
Delta de Pressão Arterial (V3 x V6)	Mensuração de Espironolactona	Mensuração de Clonidina
Sistólica	-0,006	-6,772
Diastólica	-0,040	-4,727
Teste de regressão linear		

Observa-se que tanto para a espironolactona, quanto para a clonidina, a medida que aumenta a mensuração do metabólito, diminui o delta da pressão sistólica. Já, para os indivíduos responsivos, o sinal da associação muda. A espironolactona, à medida que aumenta a mensuração do metabólito, também aumenta o delta da pressão sistólica e, para a clonidina, à medida que aumenta a mensuração, diminui o delta da pressão.

4.2 Resultados de Ancestralidade

A escolha do painel utilizado para a análise da AG dos indivíduos foi baseada do artigo de *Santos H.C. e colaboradores* ⁶³, no qual foi demonstrada a escolha destes SNPs (SNPs escolhidos em anexo) e das populações de referência utilizadas, vindas dos projetos públicos, HapMap, HGDP e 1000 Genomes, para que fosse possível, utilizando o *software* Admixture, calcular as porcentagens de ancestralidade de cada indivíduo analisado.

Mil e quinhentos e três amostras foram analisadas. Esse número não é o mesmo da quantidade final de pacientes que foram incluídos no estudo, pois as amostras de alguns pacientes tiveram que ser excluídas. Os resultados obtidos foram as proporções de ancestralidade europeia, africana e ameríndia de cada um dos indivíduos analisados.

As primeiras análises estatísticas realizadas foram dividindo as amostras em grupos de raça autodeclarada, entre indivíduos brancos e não brancos.

Os achados demográficos de idade, sexo, IMC, escolaridade, comorbidades e outras variáveis entre esses diferentes grupos estão descritos na Tabela 8.

Verificou-se diferença significativa entre os grupos em relação às idades, tendo maior percentual de indivíduos mais velhos no grupo de brancos. Houve também diferença significativa entre os grupos quando comparado o grau de escolaridade e, neste ponto, este achado pode ser relevante, uma vez que o nível de indivíduos iletrados e sem nível superior está, em maiores proporções, no grupo de pacientes não brancos.

Tabela 8. Características gerais e clínicas dos pacientes entre os grupos de raça autodeclarada.

Variáveis	Branco N = 633	Não Branco N = 870	p Valor	Intervalo de Confiança
Idade (médias)	54,33	52,73	0,003	(-2,649;-0,541)
Índice de Massa Corporal	30,66	31,2	0,11	(-0,091;1,174)
Sexo				
Homem	276	276	0,332*	(0,901;1,375)
Mulher	355	525	0,3812*	(0,734;1,120)
Nível Educacional				
Analfabeto	16	39	0,078*	(0,295;1,057)
Escola Fundamental	491	762	0,0003*	(0,466;0,801)
Nível Superior	124	91	0,0003*	(1,596;2,931)
Uso de Bebida Alcoólica				
Sim	214	328	0,297*	(0,712;1,104)
Não	417	564	0,238*	(0,919;1,423)
Uso de Tabaco				
Não Fumante	387	539	0,699*	(0,846;1,298)
Ex Fumante	183	271	0,633*	(0,747;1,183)
Fumante	61	83	0,861*	(0,726;1,502)
Insuficiência cardíaca congestiva				
Sim	2	8	0,291**	(0,036;1,776)
Não	629	885	0,206*	(0,708;9,774)
AVC				
Sim	20	39	0,2933*	(0,392;1,277)
Não	611	854	0,2196*	(0,829;2,535)
Infarto agudo do miocárdio				
Sim	5	10	0,723**	(0,188;2,285)
Não	626	883	0,491*	(0,578;4,433)
Diabetes Mellitus				
Sim	108	154	1*	(0,750;1,313)
Não	523	739	0,923*	(0,776;1,351)
Dislipidemia				
Sim	196	646	0,158*	(0,939;1,487)
Não	435	247	0,192*	(0,681;1,077)
Insuficiência cardíaca obstrutiva				
Sim	6	2	0,116**	(0,762;43,927)
Não	625	891	0,490*	(0,188;1,949)
Pressão Arterial Sistólica V0 (médias)	171,3	173,6	0,005	(0,650;3,840)
Pressão Arterial Diastólica V0 (médias)	102,3	102,9	0,348	(-0,615;1,762)

*Teste *t-student*

**Teste exato de *Fisher*

Após esta análise inicial, foi feita a verificação das diferenças entre os achados de AG em comparação com as raças autodeclaradas, porém, nesta

segunda etapa, os participantes foram divididos em brancos, pardos e negros (Tabela 9).

Tabela 9. Associação da proporção de ancestralidade com raça autodeclarada.

Ancestralidade genética	Branco N = 633	Pardo N = 500	Negro N = 370	p Valor
Europeia	0,710	0,508	0,283	$< 2,2e^{-16}$
Africana	0,175	0,350	0,633	$< 2,2e^{-17}$
Ameríndia	0,145	0,142	0,084	$< 2,2e^{-18}$

Teste *t-student*

Confirmando a diferença significativa entre as proporções de ancestralidade comparadas com as raças, foram feitas, então, as análises comparando a ancestralidade com o fato de o indivíduo ser ou não hipertenso resistente.

Neste sentido, a Tabela 10 demonstra a análise de associação da AG à hipertensão resistente.

Tabela 10. Associação da proporção ancestralidade e pacientes hipertensos resistentes ou não resistentes.

Ancestralidade genética	Não Resistente N = 1217	Resistente N = 167	p Valor
Europeia	0,540	0,520	0,304
Africana	0,344	0,367	0,257
Ameríndia	0,116	0,113	0,68

Teste de *Kruskal-Wallis*

Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias de ancestralidade de acordo com o indivíduo ser ou não hipertenso resistente.

Fizemos uma nova análise, comparando os indivíduos resistentes ou não, desta vez, com a raça autodeclarada (Tabela 11).

Tabela 11. Indivíduos hipertensos resistentes e não resistentes *versus* raça autodeclarada.

	Não Resistente N = 1193	Resistente N = 165	p Valor
Branco	509 (42,7%)	66 (40,0%)	0,779
Pardo	390 (32,7%)	55 (33,3%)	
Negro	294 (24,6%)	44 (26,7%)	

Test independente de Qui-square

Em nosso estudo, não houve associação da raça autodeclarada com os indivíduos resistentes e não resistentes.

Após estes achados de não associação, decidimos verificar possíveis associações entre a ancestralidade e o controle da pressão arterial, ou seja, dividir os indivíduos, inicialmente, pelos diferentes grupos medicamentosos que eles utilizaram (como descrito no desenho do estudo ReHOT) e, após esta divisão, classificar os pacientes como responsivos ou não ao tratamento – assim como descrito nas análises dos resultados farmacometabólicos (Tabela 12). Porém, neste caso, a resposta ou não ao tratamento foi verificada e analisada *versus* a ancestralidade em cada uma das visitas nas quais foram efetuadas trocas no tratamento, que, por sua vez, eram feitas sempre de acordo com a não resposta de controle de pressão arterial.

Tabela 12. Associação da proporção de ancestralidade e resposta ao tratamento anti-hipertensivo nos diferentes grupos de tratamento medicamentoso.

Visita 1 (Clortalidona e Enalapril)			
N= 922			
Ancestralidade genética	Não Responsivo N = 615	Responsivo N = 307	P Valor
Europeia	0,541	0,576	0,069
Africana	0,338	0,308	0,087
Ameríndia	0,121	0,116	0,479
Visita 1 (Clortalidona e Losartana)			
N= 568			
Ancestralidade genética	Não Responsivo N = 414	Responsivo N = 154	P Valor
Europeia	0,514	0,504	0,663
Africana	0,371	0,381	0,984
Ameríndia	0,115	0,115	0,986
Visita 3 (Clortalidona; Enalapril e Amlodipina)			
N= 394			
Ancestralidade genética	Não Responsivo N = 246	Responsivo N = 148	P Valor
Europeia	0,534	0,538	0,648
Africana	0,352	0,344	0,781
Ameríndia	0,114	0,118	0,654
Visita 3 (Clortalidona; Losartana e Amlodipina)			
N= 289			
Ancestralidade genética	Não Responsivo N = 181	Responsivo N = 108	P Valor
Europeia	0,505	0,487	0,524
Africana	0,387	0,404	0,587
Ameríndia	0,108	0,109	0,882
Visita 6 (Clortalidona; Enalapril; Amlodipina e Espironolactona)			
N= 53			
Ancestralidade genética	Não Responsivo N = 40	Responsivo N = 13	P Valor
Europeia	0,495	0,553	0,466
Africana	0,392	0,348	0,61
Ameríndia	0,113	0,099	0,663

Visita 6 (Clortalidona; Losartana; Amlodipina e Espironolactona)			
N= 45			
Ancestralidade genética	Não Responsivo N = 39	Responsivo N = 6	P Valor
Europeia	0,469	0,607	0,188
Africana	0,419	0,330	0,433
Ameríndia	0,112	0,063	0,195
Visita 6 (Clortalidona; Enalapril; Amlodipina e Clonidina)			
N= 50			
Ancestralidade genética	Não Responsivo N = 38	Responsivo N = 12	P Valor
Europeia	0,515	0,450	0,388
Africana	0,357	0,430	0,345
Ameríndia	0,128	0,120	0,822
Visita 6 (Clortalidona; Losartana; Amlodipina e Clonidina)			
N= 37			
Ancestralidade genética	Não Responsivo N = 27	Responsivo N = 10	P Valor
Europeia	0,498	0,527	0,758
Africana	0,417	0,381	0,721
Ameríndia	0,085	0,092	0,728

Teste de *Kruskal-Wallis*

Não foram encontradas diferenças significativas. Houve apenas tendências que poderão ser evidenciadas ou não com análises de maior número de amostras.

Por fim, foi testada uma possível associação das ancestralidades nos mesmos grupos da Tabela 11, desta vez, de acordo com a variação da pressão arterial sistólica e diastólica (Tabela 13), nos diferentes grupos medicamentosos e nas diferentes visitas nas quais esses medicamentos foram adicionados na terapêutica destes indivíduos.

Tabela 13. Associação da proporção de ancestralidade e variações de pressão arterial sistólica e diastólica nas diferentes visitas e grupos de tratamento medicamentoso.

Visita 1 (Clortalidona e Enalapril) N= 922				
Ancestralidade genética	Variação β da Pressão Sistólica (V1-V0)	P Valor	Variação β da Pressão Diastólica (V1-V0)	P Valor
Europeia	0,379	0,901	-0,115	0,95
Africana	-0,784	0,791	0,300	0,866
Ameríndia	3,160	0,693	0,041	0,993
Visita 1 (Clortalidona e Losartana) N= 568				
Ancestralidade genética	Variação β da Pressão Sistólica (V1-V0)	P Valor	Variação β da Pressão Diastólica (V1-V0)	P Valor
Europeia	-1,543	0,68	-0,693	0,764
Africana	0,980	0,78	0,709	0,741
Ameríndia	2,452	0,784	2,571	0,631
Visita 3 (Clortalidona; Enalapril e Amlodipina) N= 394				
Ancestralidade genética	Variação β da Pressão Sistólica (V3-V1)	P Valor	Variação β da Pressão Diastólica (V3-V1)	P Valor
Europeia	3,043	0,411	2,748	0,197
Africana	-3,439	0,342	-3,672	0,078
Ameríndia	4,345	0,678	8,324	0,162
Visita 3 (Clortalidona; Losartana e Amlodipina) N= 289				
Ancestralidade genética	Variação β da Pressão Sistólica (V3-V1)	P Valor	Variação β da Pressão Diastólica (V3-V1)	P Valor
Europeia	-0,654	0,896	1,622	0,595
Africana	3,062	0,512	-0,525	0,854
Ameríndia	-16,766	0,169	-5,667	0,43
Visita 6 (Clortalidona; Enalapril; Amlodipina e Espironolactona) N= 53				
Ancestralidade genética	Variação β da Pressão Sistólica (V6-V3)	P Valor	Variação β da Pressão Diastólica (V6-V3)	P Valor
Europeia	-12,903	0,075	-8,438	0,073
Africana	7,978	0,256	4,048	0,36
Ameríndia	33,562	0,079	23,278	0,046
Visita 6 (Clortalidona; Losartana; Amlodipina e Espironolactona) N= 45				
Ancestralidade genética	Variação β da Pressão Sistólica	P Valor	Variação β da Pressão Diastólica	P Valor

	(V6-V3)		(V6-V3)	
Europeia	1,891	0,872	0,895	0,914
Africana	-5,327	0,636	-6,044	0,423
Ameríndia	38,650	0,232	49,367	0,028

Visita 6 (Clortalidona; Enalapril; Amlodipina e Clonidina)

N= 50

Ancestralidade genética	Varição β da Pressão Sistólica (V6-V3)	P Valor	Varição β da Pressão Diastólica (V6-V3)	P Valor
Europeia	10,511	0,422	0,918	0,897
Africana	-5,894	0,647	-0,194	0,977
Ameríndia	-22,039	0,454	-3613,000	0,820

Visita 6 (Clortalidona; Losartana; Amlodipina e Clonidina)

N= 37

Ancestralidade genética	Varição β da Pressão Sistólica (V6-V3)	P Valor	Varição β da Pressão Diastólica (V6-V3)	P Valor
Europeia	0,351	0,958	0,945	0,907
Africana	0,691	0,912	1,271	0,860
Ameríndia	-66,937	0,358	-64,903	0,086

Teste de *Kruskal-Wallis*

Assim como nas análises anteriores, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos analisados, quando comparada a AG dos indivíduos do estudo ReHOT com: diferenças de pressão arterial pré e pós diferentes medicamentos anti-hipertensivos.

5. Discussão

5.1 Análises Farmacometabolômicas

Farmacometabolômica é um campo novo e de rápido crescimento na ciência, que usa metabolômica para estudar efeitos de medicamentos e variação na resposta a medicamentos. Recentemente, este método tem sido amplamente utilizado na pesquisa de medicina individualizada. O processo de pesquisa da farmacometabolômica relaciona as informações básicas sobre um metabólito de um indivíduo com o fenótipo de resposta a medicamentos após a exposição ao medicamento; o método pode ser usado para prever a eficácia e a toxicidade dos medicamentos, fornecendo a base teórica para o tratamento individualizado ⁸¹.

O presente estudo não visou um estudo de metabolôma em si; nosso foco foi a utilização das mensurações de metabólitos e analitos de fármacos, com o desfecho de o paciente controlar ou não sua pressão arterial, comparando diferentes tratamentos anti-hipertensivos. Nossa finalidade foi buscar diferenças significativas entre as mensurações dos diferentes analitos, nos pacientes responsivos ou não a terapêuticas distintas, vislumbrando correlacionar estas diferenças com uma possível predição de não resposta.

Neste sentido, foi desenvolvido um método exclusivo, eficaz e simples, possibilitando, por exemplo, ser utilizado na prática clínica. Para isso, foi utilizada uma coluna de RACNTs que provou ser robusta e eficiente em cerca de 300 ciclos analíticos, exibindo maior ou igual vida útil em comparação com outros estudos que empregam o mesmo tipo de material ^{62, 70, 71, 82}. A vida útil dos RACNTs também pode ser confirmada quando comparada a outros materiais de RAM, sendo até 15 vezes maior do que alguns deles ⁸³⁻⁸⁷.

A eficiência da coluna foi monitorada comparando os sinais analíticos e os perfis de pico em mais de 300 análises, utilizando a mesma coluna de extração. As comparações foram realizadas utilizando cromatogramas obtidos nos níveis de calibração mais baixo, médio e mais alto para todos os analitos determinados. Depois de comparar as áreas dos picos, verificou-se que não houve diferenças maiores do que 10% nos valores alcançados, provando que a capacidade de adsorção não foi afetada ao longo dessas 300 análises. Além disso, não foi observada qualquer modificação nos perfis de pico, mantendo os parâmetros cromatográficos – como tempo de retenção, simetria de pico e placas teóricas.

O método desenvolvido foi extremamente eficiente para extrair os analitos das amostras. Valores variando de 88,15 a 112,41% da recuperação de extração foram obtidos. Os valores de recuperação obtidos foram iguais ou superiores aos anteriormente existentes, como mostrado na Tabela 14, na qual também pode ser observado que os métodos cromatográficos que empregaram o modo de comutação de coluna obtiveram maior recuperação quando comparados aos métodos com técnicas convencionais de preparação de amostras, como extração líquido-líquido (LLE) e extração de fase sólida (SPE), demonstrando a capacidade das colunas RAMs de fornecer alta recuperação na preparação de amostra *online*.

Este estudo foi realizado com número aparentemente suficiente de amostras e este fato pode ser confirmado comparando nosso N, de 171 amostras, com a literatura, na qual existem estudos com quantidade menor de amostras⁸⁸⁻⁹¹. Entretanto, nosso limite de quantificação, baseado na literatura,

não foi o capaz de analisar todas as amostras mensuradas, pois algumas delas saíram do padrão que havia sido descrito, isso talvez por ser de paciente politratado. Assim, acabamos trabalhando com um resultado final de poucas amostras, quando estratificadas pelos grupos medicamentosos que trabalhamos. Portanto, a capacidade de extrapolar os resultados encontrados pode ser limitada. Estudos adicionais, com número maior de pacientes, devem ser realizados, para avaliação mais abrangente, e isso é viável, uma vez que este estudo contou com 1.597 pacientes e apenas 171 amostras foram analisadas neste projeto.

Sendo assim, a associação buscada não foi encontrada, entretanto, este resultado não diminui a importância desta metodologia para a literatura e para estudos, por exemplo, de aderência aos medicamentos – o que segue sendo um grande problema na detecção de pacientes hipertensos resistentes.

Tabela 14. Comparação do método proposto com alguns métodos anteriores para a determinação dos analitos.

Analitos	Extração	Método	Amostra	Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
ELP, ENT, CND, SPL, LOS, LCA, N2G e AML	CS ¹ -SPE ² <i>online</i> (RACNTs)	UPLC- MS/MS	Soro Humano	20-500 (ELP), 20-200 (ENT), 0,40-50 (CND), 40-250 (SPL), 30-350 (LOS), 50-350 (LCA), 60-350 (N2G) e 0,6- 20 (AML)	88,15-111,71 (ELP), 91,91-98,51 (ENT), 87,80-101,59 (CND), 97,98-104,26 (SPL), 94,88-112,41 (LOS), 93,85-102,32 (LCA), 88,41-97,37 (N2G) e 100,1-100,7 (AML)	3,10 (ELP), 4,67 (ENT), 0,09 (CND), 4,67 (SPL), 4,28 (LOS), 4,97 (LCA), 10,85 (N2G) e 0,12 (AML)	10,33 (ELP), 15,58 (ENT), 0,30 (CND), 15,57 (SPL), 14,26 (LOS), 16,57 (LCA), 36,17 (N2G) e 0,41 (AML)	Método proposto
AML	CS ¹ -SPE ² <i>online</i> (Coluna quiral)	HPLC - UV	Plasma Humano	0,5-10,0	-	0,2	0,5	92
CND	LLE ³	HPLC- MS/MS	Plasma Humano	0,01–2,0	75,1-80,3	-	0,01	93
ELP e ENT	SPE ² <i>offline</i>	HPLC- MS	Soro Humano	1,61–206,0 (ELP) e 1,84- 236,0 (ENT)	72,6-88,69 (ELP) e 73,13-92,62 (ENT)	-	1,64 (ELP) e 1,88 (ENT)	94
ELP	CS ¹ -SPE ² <i>online</i> (coluna RP ⁴ -Strata-X [®])	LC/ESI- MS/MS	Água	0,01-0,059	99,6-124,8	0,019	0,058	95

LOS e LCA	CS ¹ -SPE ² <i>online</i> (coluna RP ⁴)	HPLC - UV	Plasma de ratos	20–1,000 (LOS e LCA)	88,4 (LOS) e 85,9 (LCA)	20,0	46,9 (LOS) e 50,1 (LCA)	⁹⁶
SPL	PP ⁵ -SPE ² <i>offline</i>	UHPLC- UV	Plasma Humano	230-20,000	62,0-75,1	70,0	230,0	⁹⁷
SPL	CS ¹ -SPE ² <i>online</i> (coluna RP ⁴)	HPLC- UV	Urina Humana	0,5-10,0	101,0-104,0	20,0	70,0	⁹⁸
AML e CND	PP ⁵	UPLC– MS/MS	Plasma Humano	0,336-1,109 (CND) e 7,8- 12,7 (AML)	102,8-112,6 (CND) e 74,6-85,6 (AML)	0,039 (CND) e 0,019 (AML)	0,078 (CND) e 0,312 (AML)	⁹⁹
ELP, ENT e SPL	SPE ² <i>offline</i> - MEPS ⁶	UHPLC –UV	Urina Humana	50-30,000 (ELP), 500-30,000 (ENT) e 30-20,000 (SPL),	70,1-98,3	14,0 (ELP), 15,0 (ENT) e 8,0 (SPL)	43,0 (ELP), 44,0 (ENT) e 24,0 (SPL)	¹⁰⁰

¹Column switching.

²Extração de fase sólida

³Extração líquido-líquido.

⁴Extração de fase reversa.

⁵Precipitação de proteínas.

⁶Microextração por sorvente embalado.

5.2 Análises de Ancestralidade Genética

A raça de um indivíduo pode afetar sua saúde por influências genéticas e ambientais. A influência genética é explicada pelo fato de que pessoas com ancestralidades iguais compartilham de semelhança em algumas regiões no genoma e, conseqüentemente, possuem mutações comuns e perfis genéticos semelhantes. Por causa de muitas dessas mutações estarem relacionadas com o risco DCVs, esta similaridade da raça pode conferir similaridade ao risco de doenças também ¹⁰¹. Quanto aos efeitos ambientais, práticas culturais, nível de estresse, escolaridade, acesso a serviços de saúde e estilo de vida podem influenciar também na saúde dos indivíduos; no entanto, as vias pelas quais essa associação ocorre não são claras ¹⁰².

Visando procurar esta similaridade entre AG e risco de doenças, o presente estudo propôs avaliar se existia uma possível associação da ancestralidade genética com a resposta farmacoterapêutica de pacientes hipertensos e com a hipertensão resistente, levando em consideração que prever esta condição, de ruim prognóstico, seria de grande valia para esta subclasse de pacientes.

Os resultados encontrados, em nossa população de estudo, referente às proporções de ancestralidade entre as diferentes raças, estão de acordo com a literatura ^{59, 63, 103, 104}. O maior componente ancestral entre os indivíduos brancos é o europeu (0,71); para indivíduos negros, é o africano (0,633). Entre os indivíduos pardos, o componente predominante é o europeu (0,508), com proporção significativa, também, do componente africano (0,35).

Estudos que consideram a AG em populações miscigenadas, são escassos na literatura, apesar deste tipo de população estar em franco aumento. Um estudo do Reino Unido, mostrou que mais de 1 milhão de pessoas se identificam como “miscigenadas”, confirmando que as populações miscigenadas estão aumentando cada vez mais ¹⁰⁵.

Visando utilizar estes resultados de ancestralidade para associá-los a HR, várias análises foram realizadas, porém nenhuma delas chegou a uma associação estatisticamente significativa. Desta forma, os 187 pacientes HR encontrados no estudo ReHOT (cerca de 11,7%), com maior risco cardiovascular, não foram associados com uma predição referente à AG.

Estudos da literatura mostraram associação da etnia africana com maior prevalência de pacientes com HR. Um deles, que foi feito na Califórnia, em uma população étnica e socioeconomicamente diversificada, identificou uma coorte de HR de 12,8% dos pacientes hipertensos, descobrindo-se que eles eram mais propensos a serem negros ⁴⁹⁻⁵¹.

Em relação a não associação da ancestralidade com HR, desconhecemos outro estudo que tenha encontrado resultados semelhantes ao nosso. O estudo que mais se aproximou ao nosso resultado foi o de Calhoun D.A. et al¹⁰⁶, que demonstrou que um subtipo de pacientes com HR, com hiperaldosteronismo primário, foi comum em pacientes negros e brancos, sem qualquer predisposição. Já outro estudo, sobre HR e falha ao tratamento anti-hipertensivo, demonstrou que existia proporção semelhante em negros e brancos com esta falha ao tratamento ¹⁰⁷.

Em paralelo à busca de uma associação entre a HR e a AG, foi estudada a possibilidade de encontrar uma associação da AG com um melhor controle da PA, associada a melhor escolha terapêutica. Na população do estudo ReHOT, esta associação não foi encontrada, diferente do estudo *AIM-HY INFORM*, de Omar Mukhtar M.R.C.P. et al¹⁰⁵, que correlacionou terapias anti-hipertensivas com a AG na população do Reino Unido, refinando assim as escolhas baseadas em uma classificação de “negros *versus* brancos”.

Estudos designados à pacientes hipertensos e principalmente hipertensos resistentes, são de extrema importância, principalmente em populações miscigenadas como às do Brasil, onde encontrar possíveis correlações com este prognóstico é ainda mais difícil. Ademais, a prevalência desta doença crescerá consideravelmente, pois há grande quantidade de indivíduos com sobrepeso/obesidade ¹⁰⁸ e, além disso, após as Diretrizes de Hipertensão de 2017 ⁵⁴, o critério de diagnóstico de HR, considerando a pressão arterial, foi reduzido de $\geq 140 \times 90$ mmHg para $> 130 \times 80$ mmHg, aumentando ainda mais a quantidade de pacientes diagnosticados como hipertensos resistentes. Desta forma, a não associação encontrada neste estudo contribui para a literatura como um dado novo da população brasileira e poderá corroborar novos estudos que busquem outras condições que possam ser associadas a esta doença.

6. Conclusões

O método analítico validado foi capaz de cumprir com maestria e inovação o objetivo proposto, se mostrando simples, rápido, reprodutível e com parâmetros de validação adequados, de acordo com as diretrizes da FDA. Os resultados quantitativos não foram capazes de encontrar uma associação com as respostas terapêuticas desejadas, entretanto, estudos deste tipo são importantes para conferência de aderência, por exemplo, que é algo que também está associado ao não controle da pressão arterial, ou, até mesmo, com uma falsa identificação de hipertensos resistentes.

As análises de ancestralidade se mostram muito importantes, uma vez que a identificação e o tratamento diferenciado desses pacientes hipertensos resistentes ainda são uma necessidade não atendida. Entretanto, esta associação entre a ancestralidade e a hipertensão resistente não foi encontrada nestes pacientes do estudo ReHOT.

Visamos encontrar uma associação das concentrações dos anti-hipertensivos utilizados pelos pacientes hipertensos deste projeto e da ancestralidade genética, com a predisposição à hipertensão resistente – o que não foi possível. Uma possível explicação do resultado analítico poderia ser a quantidade de pacientes analisados. Já, quanto à ancestralidade, pode ter sido devido à real não associação destes fatos nos pacientes deste estudo.

7. Anexos

Anexo A – Frequência alélica dos Marcadores Informativos de Ancestralidade

SNP	Crom	A1	A2	Gene	Frequência de alelo de referência			População
					EUR	AFR	AMR	
rs10493066	1	T	C	SFPQ	0.0336	0.6368	0.76	EUR
rs11804831	1	C	T	UBE2J2	0.1621	0.91791	0.95	EUR
rs12119556	1	A	G	LOC728716	0.1166	0.0177	0.81	AMR
rs12135987	1	A	G	PRDM16	0.2806	0.1309	0.94	AMR
rs3827730	1	C	T	FAF1	0.3406	0.06471	0.95	AMR
rs4844413	1	T	C	PLXNA2	0.1344	0.1735	0.95	AMR
rs6429644	1	C	T	SLC6A9	0.08135	0.8817	0.03	AFR
rs726570	1	T	C	-	0.2708	0.1162	0.94	AMR
rs955613	1	T	C	-	0.2787	0.08824	0.94	AMR
rs10173381	2	G	A	EXOC6B	0.1996	0.93385	0.01	AFR
rs10179812	2	G	T	CCDC141	0.08893	0.02353	0.77	AMR
rs10202644	2	T	C	FAM178B	0.1838	0.06765	0.91	AMR
rs10205952	2	G	T	DPP10	0.2004	0.07988	0.92	AMR
rs10497191	2	T	C	ACVR1	0.1304	0.91029	0.04	AFR
rs11096686	2	C	T	-	0.1126	0.775	0.86	EUR
rs11123869	2	A	G	ZAP70	0.2451	0.04118	0.95	AMR
rs12470024	2	A	G	WIPF1	0.2233	0.03088	0.98	AMR
rs12471054	2	T	C	MIR2467;HDAC4	0.05138	0.05	0.81	AMR
rs12714093	2	A	G	-	0.4048	0.02515	0.98	AMR
rs1466020	2	G	A	TMEM131;ZAP70	0.2312	0.03392	0.94	AMR
rs17044697	2	C	T	DPP10	0.1957	0.09265	0.93	AMR
rs1991600	2	T	C	WIPF1	0.251	0.1265	0.98	AMR
rs2084713	2	A	G	VWA3B	0.3083	0.01324	0.96	AMR
rs2176046	2	A	G	HDAC4	0.05731	0.02647	0.81	AMR
rs2280355	2	A	G	FER1L5;LMAN2L	0.1976	0.03392	0.92	AMR
rs260690	2	C	A	EDAR	0.0498	0.6513	0.94	EUR
rs260714	2	T	C	EDAR	0.1028	0.8038	0.94	EUR
rs2711302	2	G	A	PRKCE	0.1304	0.03557	0.83	AMR
rs3754675	2	C	T	NPAS2	0.08696	0.02663	0.92	AMR
rs4241135	2	G	A	DPP10	0.1996	0.09412	0.92	AMR
rs4851839	2	A	G	VWA3B	0.3182	0.06618	0.99	AMR
rs4852013	2	A	G	MIR4440;HDAC4	0.1647	0.04853	0.86	AMR
rs721390	2	T	G	LRRTM4	0.249	0.08555	0.95	AMR
rs10935323	3	G	T	COPB2	0.2668	0.07206	0.95	AMR
rs17008327	3	A	G	-	0.04348	0.05294	0.89	AMR
rs3870336	3	A	G	DAG1	0.08696	0.1118	0.85	AMR
rs4855697	3	G	A	FLJ22763	0.3775	0.08824	0.97	AMR
rs4955903	3	C	T	CACNA2D3	0.3182	0.06912	0.94	AMR
rs702032	3	T	C	MYLK	0.06719	0.8426	0.67	EUR
rs710493	3	G	A	-	0.01779	0.8462	0.01	AFR
rs7432238	3	G	T	SATB1	0.07115	0.02059	0.8	AMR
rs868767	3	G	A	-	0.1056	0.02794	0.83	AMR
rs9871910	3	G	A	FAM19A4	0.1957	0.125	0.91	AMR
rs1876495	4	T	C	APBB2	0.1865	0.02206	0.88	AMR
rs2063393	4	C	T	-	0.2826	0.1003	0.93	AMR
rs2874414	4	G	A	-	0.2092	0.1756	0.94	AMR
rs4431170	4	G	A	41334	0.03162	0.07647	0.81	AMR
rs4532240	4	T	G	-	0.2292	0.03687	0.9	AMR

rs4647693	4	C	T	CASP3	0.2411	0.1879	0.95	AMR
rs4698702	4	A	C	-	0.1403	0.08133	0.94	AMR
rs7660290	4	G	T	ADAMTS3	0.1601	0.8912	0.88	EUR
rs10079352	5	G	A	-	0.4087	0.06471	0.98	AMR
rs10454965	5	G	A	TENM2	0.1028	0.02212	0.88	AMR
rs10473594	5	C	T	CDH12	0.1858	0.05	0.8878	AMR
rs12522914	5	T	C	PDZD2	0.05929	0.05882	0.84	AMR
rs13357733	5	A	G	CDH12	0.1126	0.08382	0.88	AMR
rs1366220	5	A	G	-	0.3063	0.06471	0.93	AMR
rs17053011	5	T	G	-	0.126	0.01786	0.81	AMR
rs1895218	5	A	C	-	0.2075	0.01622	0.89	AMR
rs1948748	5	C	T	CDH12	0.1265	0.09587	0.8878	AMR
rs2042314	5	T	C	-	0.1759	0.1559	0.93	AMR
rs28777	5	C	A	SLC45A2	0.0241	0.7874	0.93	EUR
rs4145160	5	A	G	GRIA1	0.08103	0.1324	0.87	AMR
rs4701170	5	A	G	-	0.166	0.08088	0.88	AMR
rs4868237	5	T	C	ATP6V0E1	0.1126	0.01765	0.8	AMR
rs7728435	5	C	T	SLIT3	0.3992	0.06765	0.97	AMR
rs10484813	6	G	A	PARK2	0.1512	0.05373	0.87	AMR
rs10945764	6	A	G	PARK2	0.3413	0.04167	0.94	AMR
rs11153123	6	G	A	-	0.2945	0.1074	0.94	AMR
rs16888746	6	A	G	PARK2	0.1344	0.04475	0.86	AMR
rs1744173	6	A	G	SYNJ2	0.125	0.02206	0.91	AMR
rs350289	6	A	G	SYNJ2	0.1126	0.02794	0.91	AMR
rs3823159	6	G	A	PDE7B	0.004016	0.8363	0.6	EUR
rs4143683	6	C	T	TIAM2	0.2431	0.1015	0.93	AMR
rs4896046	6	T	C	LINC01010	0.2369	0.04599	0.93	AMR
rs6570644	6	G	A	UTRN	0.256	0.93529	0.96	EUR
rs7753890	6	C	T	PDE7B	0.01581	0.8471	0.02	AFR
rs12701660	7	T	C	VPS41	0.3281	0.2132	0.98	AMR
rs1550392	7	T	C	-	0.2004	0.06618	0.89	AMR
rs17166119	7	G	A	-	0.253	0.09292	0.91837	AMR
rs2040502	7	C	T	GRM8	0.2925	0.1529	0.96	AMR
rs2471552	7	C	T	-	0.2095	0.08971	0.93	AMR
rs731257	7	A	G	SCIN	0.1087	0.025	0.91	AMR
rs978874	7	C	T	GRM8	0.2866	0.1544	0.96	AMR
rs11776114	8	A	G	-	0.3142	0.04265	0.95	AMR
rs17072176	8	G	T	-	0.1502	0.01946	0.84	AMR
rs17807624	8	T	C	-	0.2945	0.1431	0.97	AMR
rs400404	8	G	T	-	0.2632	0.1627	0.98	AMR
rs4870958	8	G	A	-	0.1706	0.08676	0.89	AMR
rs4875427	8	G	A	CSMD1	0.2905	0.1195	0.94	AMR
rs6993205	8	G	A	-	0.496	0.95441	1,000	AMR
rs7018273	8	G	A	PAG1	0.01186	0.7876	1,000	AFR
rs896680	8	T	C	-	0.1687	0.1701	0.91	AMR
rs10812316	9	C	T	-	0.05534	0.7198	0.78	EUR
rs10962599	9	C	T	LOC648570;BNC2	0.2411	0.95525	0.93	EUR
rs1412512	9	C	T	PPP1R26- AS1;PPP1R26	0.2016	0.2441	0.95	AMR
rs4135211	9	C	A	TXN	0.05929	0.005837	0.77	AMR
rs4877068	9	A	G	-	0.09881	0.0531	0.83	AMR
rs4979274	9	A	C	-	0.1206	0.02529	0.82	AMR
rs10821745	10	G	T	ANK3	0.06126	0.08676	0.85	AMR

rs10994397	10	T	C	ANK3	0.08103	0.08407	0.86	AMR
rs12220128	10	C	A	-	0.1265	0.08824	0.85	AMR
rs1419138	10	C	T	-	0.04941	0.8324	0.77	EUR
rs17130385	10	T	G	-	0.0751	0.0295	0.84	AMR
rs17143387	10	G	T	-	0.1621	0.05735	0.86	AMR
rs3998448	10	T	C	-	0.3267	0.02811	0.93	AMR
rs4746136	10	A	G	USP54	0.1508	0.01961	0.87	AMR
rs4880510	10	G	T	ADARB2	0.09486	0.08676	0.84	AMR
rs4880511	10	A	C	ADARB2	0.09486	0.02941	0.84	AMR
rs4918842	10	C	T	HABP2	0.1364	0.08382	0.87	AMR
rs4948418	10	T	C	ANK3	0.08135	0.01367	0.85	AMR
rs6482103	10	C	A	PLXDC2	0.09091	0.08971	0.89	AMR
rs6585227	10	T	C	-	0.08893	0.2257	0.94	AMR
rs734241	10	A	G	-	0.08333	0.05	0.93	AMR
rs7902158	10	G	A	NRG3	0.2075	0.90294	0.92	EUR
rs7917775	10	C	A	-	0.06944	0.08382	0.83	AMR
rs7919248	10	G	T	-	0.08893	0.075	0.93	AMR
rs7923994	10	G	A	-	0.1719	0.3735	0.99	AMR
rs853577	10	A	G	CASC2	0.0415	0.7035	0.77	EUR
rs912069	10	C	T	-	0.2391	0.2507	0.96	AMR
rs1535	11	G	A	FADS2	0.3142	0.1147	0.96	AMR
rs1561937	11	G	A	-	0.06746	0.8426	1,000	AFR
rs1638566	11	G	T	CLCF1;LOC100130987; POLD4	0.06522	0.8264	0.73	EUR
rs1638567	11	C	T	CLCF1;LOC100130987; POLD4	0.06522	0.8274	0.73	EUR
rs16921059	11	C	T	AMOTL1	0.1957	0.1441	0.96	AMR
rs174546	11	T	C	TMEM258;MIR611; FADS1;FEN1	0.3083	0.03382	0.96	AMR
rs174570	11	T	C	FADS2	0.123	0.01618	0.92	AMR
rs2241667	11	G	T	AMOTL1	0.1957	0.07206	0.96	AMR
rs2403512	11	C	T	GALNT18	0.1779	0.03382	0.92	AMR
rs2619206	11	A	G	-	0.1235	0.06716	0.93	AMR
rs3736508	11	T	C	PHF21A	0.02191	0.007812	0.81	AMR
rs4309121	11	C	T	AMOTL1	0.1581	0.01176	0.97	AMR
rs4963452	11	C	T	-	0.1295	0.1324	0.92	AMR
rs599190	11	A	G	-	0.1917	0.03687	0.94	AMR
rs674499	11	A	G	KDM2A	0.07645	0.8259	0.73	EUR
rs10878834	12	C	T	-	0.08103	0.1971	0.91	AMR
rs11521	12	T	C	C12orf44	0.1957	0.08824	0.89	AMR
rs11612312	12	C	T	ACVR1B	0.2036	0.04102	0.92	AMR
rs1397560	12	A	C	-	0.1567	0.1941	0.93	AMR
rs2051827	12	A	G	-	0.05138	0.04706	0.84	AMR
rs2052386	12	A	G	-	0.09486	0.1	0.91	AMR
rs2216437	12	G	A	-	0.083	0.1971	0.91	AMR
rs3851621	12	C	T	-	0.06126	0.02794	0.75	AMR
rs1000973	13	A	G	PIBF1	0.2569	0.1191	0.93	AMR
rs17359176	13	A	G	-	0.082	0.01039	0.81	AMR
rs2166624	13	A	G	-	0.3794	0.03696	0.98	AMR
rs566996	13	T	C	-	0.2391	0.04412	0.89	AMR
rs9563982	13	G	A	-	0.1554	0.0374	0.84	AMR
rs11844034	14	G	A	NPAS3	0.3241	0.1696	0.98	AMR
rs17119138	14	G	A	LINC00648	0.253	0.07647	0.94	AMR
rs17126825	14	A	G	-	0.1107	0.03971	0.82	AMR

rs1958099	14	G	T	MDGA2	0.1601	0.06342	0.89	AMR
rs7142344	14	T	C	NRXN3	0.09325	0.91298	0.02	AFR
rs810087	14	A	G	PRKCH	0.127	0.95	0.7653	EUR
rs11161328	15	G	A	GABRB3	0.2857	0.174	0.96	AMR
rs11631047	15	T	C	CA12	0.2154	0.075	0.88	AMR
rs11637235	15	C	T	DUT	0.2273	0.96176	0.98	EUR
rs12594483	15	A	G	CDAN1;STARD9	0.07708	0.94355	0.16	AFR
rs12594750	15	C	T	-	0.1166	0.08728	0.86	AMR
rs12917189	15	C	T	CDAN1	0.2174	0.94531	0.03	AFR
rs1448484	15	G	A	OCA2	0.005917	0.8235	1,000	AFR
rs16951105	15	G	A	MAP2K5	0.2451	0.05588	0.93	AMR
rs2122497	15	T	C	MEIS2	0.2242	0.06324	0.92	AMR
rs3884558	15	A	G	-	0.09486	0.226	0.92	AMR
rs6494489	15	T	C	RBPMS2	0.3287	0.1519	0.97	AMR
rs8030587	15	A	G	STARD9	0.1937	0.94853	0.03	AFR
rs974828	15	T	C	RORA	0.083	0.91765	0.03	AFR
rs4141505	16	A	G	-	0.06126	0.09853	0.85	AMR
rs4889490	16	T	G	-	0.4071	0.03113	0.96	AMR
rs1049620	17	T	C	PHB	0.164	0.1553	0.91	AMR
rs1107704	17	G	A	CD300LB	0.09684	0.91176	0.07	AFR
rs2052074	17	G	A	BCAS3	0.1581	0.92206	0.03	AFR
rs4789659	17	G	A	-	0.129	0.941	0.06	AFR
rs9916327	17	A	G	LOC339166	0.1621	0.04559	0.89	AMR
rs12104228	19	C	T	ARHGEF1	0.005929	0.7868	1,000	AFR
rs2074928	19	T	C	CLC	0.03755	0.005837	0.79	AMR
rs2313048	19	G	A	-	0.1719	0.03088	0.88	AMR
rs717225	19	G	A	ARHGEF1;CD79A	0.005929	0.8162	1,000	AFR
rs7252511	19	T	C	TMPRSS9	0.1897	0.05294	0.9	AMR
rs1555133	20	A	G	C20orf112	0.2826	0.1309	0.94	AMR
rs4811693	20	T	C	FAM210B;AURKA	0.06324	0.09265	0.82	AMR
rs6026036	20	A	G	-	0.3142	0.08088	0.94898	AMR
rs1626109	21	T	C	-	0.04382	0.8544	0.01	AFR
rs2248656	21	G	A	TIAM1	0.166	0.02794	0.84	AMR
rs2269160	21	T	G	PDE9A	0.4306	0.08676	0.98	AMR
rs2823850	21	T	C	LINC00478	0.004	0.8289	0.01	AFR
rs2837371	21	A	C	DSCAM	0.1225	0.08676	0.93	AMR
rs2838665	21	A	G	-	0.2837	0.1298	0.95	AMR
rs717177	21	C	T	-	0.2668	0.1353	0.96	AMR
rs13054099	22	C	T	ST13;MIR4766; SLC25A17	0.2826	0.02756	0.93	AMR
rs2024566	22	G	A	ZC3H7B	0.3532	0.1029	0.97	AMR
rs3927	22	C	T	ZC3H7B	0.2787	0.05	0.97	AMR

Genoma de referência: hg19

AFR – Africano

EUR – Europeu

AMR – Ameríndio

Anexo B - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo Multicêntrico de pacientes com hipertensão arterial para identificação de pacientes resistentes e padronização de esquemas terapêuticos

Pesquisador: EDUARDO MOACYR KRIEGER

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 85907018.2.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.753.118

Apresentação do Projeto:

Trata-se do subprojeto relacionado ao projeto original intitulado "Estudo Multicêntrico de pacientes com hipertensão arterial para identificação de pacientes resistentes e padronização de esquemas terapêuticos", número CAAE: 85907018.2.0000.0068. Na presente resposta à pendência no parecer inicial, o pesquisador solicita mudança do título do subprojeto Solicito a mudança do título do subprojeto "Avaliações Farmacogenéticas e Farmacometabolômicas para fármacos anti-hipertensivos" para "Avaliações farmacometabolômicas e de ancestralidade genética em pacientes hipertensos de um estudo clínico randomizado".

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos do subprojeto "Avaliações farmacometabolômicas e de ancestralidade genética em pacientes hipertensos de um estudo clínico randomizado":- Identificar polimorfismos associados à efetividade no tratamento da hipertensão, aos efeitos adversos medicamentosos ou à resistência ao tratamento;- Associar as alterações metabolômicas às respostas ao tratamento, aos efeitos adversos, aos hipertensos resistentes, ou aos possíveis efeitos dos polimorfismos analisados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos, tendo em vista que consiste de um sub-estudo, onde não serão mais realizadas coletas ou procedimentos com os pacientes. Apenas análise do material coletado e análise de

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

dados. Risco mínimo apenas relativo à quebra de confidencialidade, porém assegurada pelos pesquisadores. Benefícios: Contribuição científica e futuramente, contribuição para a prática clínica destinada ao grupo de pacientes hipertensos resistentes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O racional para o presente estudo está bem fundamentado: A identificação de fatores genéticos ligados à hipertensão resistente pode contribuir para a identificação de pacientes de alto risco cardiovascular que, por sua vez, possam vir a se beneficiar com intervenções diagnósticas e terapêuticas, com o objetivo final de diminuir a pressão arterial. Neste contexto, os pesquisadores objetivam tanto identificar polimorfismos associados à efetividade no tratamento da hipertensão, quanto associar alterações metabólicas às respostas ao tratamento, efeitos adversos, ou possíveis efeitos dos polimorfismos analisados. A metodologia laboratorial do estudo envolve a análise do material já coletado durante as fases do projeto principal. Os autores descrevem que as amostras biológicas estão armazenadas em biorrepositório no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular no 10º andar do Incor. Tal armazenamento teve aprovação prévia do comitê de ética. Toda a metodologia específica referente à extração e avaliação do DNA genômico (a partir dos leucócitos do sangue periférico), assim como referente às análises dos polimorfismos genéticos (Genotipagem pela tecnologia Taqman® OpenArray®) estão detalhadamente descritas no projeto original. Da mesma forma, todos os genes e polimorfismos selecionados para o estudo de farmacogenética da hipertensão foram devidamente mencionados (tabela 2) no projeto. Também a metodologia referente à análise farmacometabólica está bem descrita, com descrição dos metabólitos a serem analisados. Não há objeções éticas quanto ao projeto. Importante ressaltar que os pesquisadores reiteraram a necessidade de prorrogar o projeto para final em dezembro de 2021.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram verificados na primeira submissão do sub-projeto, sem objeções. Nesta segunda submissão, os pesquisadores submeteram a carta em resposta à pendência, tal como solicitado, frente ao seguinte trecho do TCLE original: "Uma amostra do seu sangue e do seu DNA (material genético) que será coletado de seu sangue deverão ser congelados e armazenados no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração - HCFMUSP, sob responsabilidade do diretor deste laboratório, para possíveis análises futuras, QUE SOMENTE SERÃO ANALISADAS COM O SEU CONSENTIMENTO". Nesta carta, ficou claro que na leitura do TCLE do projeto original, foi explicado que a amostra de sangue poderia ser utilizada em estudos futuros, e desta forma não seria aplicado novo TCLE.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.753.118

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência respondida. Projeto aprovado sem objeções.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_999295.pdf	10/05/2018 12:26:37		Aceito
Outros	Resposta_Pendencia_2623333.pdf	10/05/2018 12:25:15	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Folha de Rosto	FR_PB_ASSINADA.pdf	19/03/2018 10:31:41	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Parecer Anterior	fr_sisnep.pdf	13/03/2018 18:49:25	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Relatorio_parcial_2018.pdf	13/03/2018 11:20:59	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Relatorio_parcial_ReHOT_06_2016.pdf	21/02/2018 15:42:14	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_CAPPesq_2016_15_09.pdf	21/02/2018 15:41:36	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	orcamento_subprojeto.pdf	21/02/2018 15:41:23	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Subprojeto_2016_01_06.pdf	21/02/2018 15:41:00	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Carta_inclusao_de_subprojeto_2016_13_07.pdf	21/02/2018 15:40:14	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Relato_de_evento_adverso_centros.pdf	21/02/2018 15:31:40	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Termo_de_aceite_CNPq.pdf	21/02/2018 15:26:19	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_HCFMUSP_23_08_2012.pdf	21/02/2018 15:25:56	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.753.118

Justificativa de Ausência	TCLE_HCFMUSP_23_08_2012.pdf	21/02/2018 15:25:56	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao_16_06_2009.pdf	21/02/2018 15:25:37	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Solicitacao_de_transferencia_HCFMUSP_para_INCOR.pdf	21/02/2018 15:25:22	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Solicitacao_de_reorientacao_das_atividades_HCFMUSP.pdf	21/02/2018 15:23:16	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Solicitacao_de_avaliacao_antecipada.pdf	21/02/2018 15:22:51	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Solicitacao_CNPq.pdf	21/02/2018 15:21:34	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Relato_de_evento_adverso_grave_07_06_2011.pdf	21/02/2018 15:20:44	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Relacao_Centros_Participantes.pdf	21/02/2018 15:16:04	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Projeto_ReHot.pdf	21/02/2018 15:15:12	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_EmendaA_versao_11_08_2009.pdf	21/02/2018 15:14:29	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Unifesp_18_12_2009.pdf	21/02/2018 15:13:23	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Unifesp_16_04_2010.pdf	21/02/2018 15:12:51	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_UNICSAL_AL_04_12_2009.pdf	21/02/2018 15:12:36	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Unicamp_24_11_2009.pdf	21/02/2018 15:12:20	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Unesp_05_04_2010.pdf	21/02/2018 15:11:59	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_UFS_SE_12_11_2009.pdf	21/02/2018 15:11:39	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_UFRJ_30_11_2009.pdf	21/02/2018 15:11:14	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_UFPE_29_10_2009.pdf	21/02/2018 15:10:53	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_UFG_23_02_2009.pdf	21/02/2018 15:10:26	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_UFES_03_03_2010.pdf	21/02/2018 15:09:38	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_UFC_CE_05_03_2010.pdf	21/02/2018 15:09:06	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_UERJ_16_12_2009.pdf	21/02/2018 15:08:14	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.753.118

Parecer Anterior	Parecer_PUC_RS_19_03_2010.pdf	21/02/2018 15:07:03	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Parecer_Parte_I.pdf	21/02/2018 15:03:50	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_IDPC_03_11_2009.pdf	21/02/2018 15:03:20	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_IC_FUC_RS_18_11_2009.pdf	21/02/2018 15:02:50	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_HUAR_UFF_RJ_11_12_2009.pdf	21/02/2018 15:02:34	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_HSI_BA_23_02_2010.pdf	21/02/2018 15:02:14	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_HCRP_USP_26_05_2010.pdf	21/02/2018 15:01:50	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_HCPA_11_01_2010.pdf	21/02/2018 15:01:09	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_HAN_BA_03_11_2009.pdf	21/02/2018 15:00:41	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Cappesq_HCFMUSP_17_12_2009.pdf	21/02/2018 15:00:29	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Cappesq_HCFMUSP_17_09_2009.pdf	21/02/2018 15:00:10	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Cappesq_HCFMUSP_16_09_2009.pdf	21/02/2018 14:59:41	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Cappesq_17_09_2012.pdf	21/02/2018 14:59:28	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Cappesq_07_01_2014.pdf	21/02/2018 14:58:26	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Cappesq_03_11_2011.pdf	21/02/2018 14:57:30	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Cappesq_02_09_2009_b.pdf	21/02/2018 14:57:19	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Orçamento	Orcamento_2009.pdf	21/02/2018 14:56:56	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Folha_de_rosto_pb.pdf	21/02/2018 14:56:42	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Informacoes_adicionais.pdf	21/02/2018 14:56:05	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Esclarecimentos_solicitacao_de_transferencia_HCFMUSP_para_INCOR.pdf	21/02/2018 14:55:12	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	CRF_ficha_clinica.pdf	21/02/2018 14:53:53	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_HC_07_07_2009.pdf	21/02/2018 14:53:31	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Carta_24_04_2009.pdf	21/02/2018	EDUARDO MOACYR	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.753.118

Outros	Carta_24_04_2009.pdf	14:52:57	KRIEGER	Aceito
Outros	Anexo_II.pdf	21/02/2018 14:52:30	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito
Outros	Anexo_A.pdf	21/02/2018 14:52:04	EDUARDO MOACYR KRIEGER	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Julho de 2018

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010

UF: SP Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Protocolo: "Estudo Multicêntrico de pacientes com hipertensão arterial para identificação de pacientes resistentes e padronização de esquemas terapêuticos"

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Estudo Multicêntrico de pacientes com hipertensão arterial para identificação de pacientes resistentes e padronização de esquemas terapêuticos"

PESQUISADOR:
CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº
UNIDADE/DEPARTAMENTO:.....

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 semanas (para cada paciente) e 2 anos de duração do projeto completo.

1 – Você está sendo convidado a participar do “Estudo Multicêntrico de pacientes com hipertensão arterial para identificação de pacientes resistentes e padronização de esquemas terapêuticos” que tem o objetivo de avaliar se os medicamentos para tratamento da pressão arterial alta existentes nas Unidades Básicas de Saúde conseguem controlar a pressão arterial dos brasileiros. Além disso, caso a sua pressão não consiga ser controlada com o uso de três desses remédios (clortalidona, enalapril ou losartana, e anlodipino) você será tratado com a associação de mais um medicamento de pressão (espironolactona ou clonidina). Estes remédios são utilizados pelos hospitais e receitados pelos médicos para o controle da pressão arterial há mais de 15 anos. Caso seja difícil controlar a sua pressão (ou seja, se você é um paciente resistente ao tratamento), nosso estudo procurará saber qual é o fator responsável.

2 – Você terá a sua pressão avaliada com o aparelho de medir pressão, fará exames de urina e será submetido a exames de sangue que serão tirados de uma veia do braço com seringas e agulhas descartáveis. Os exames do seu sangue são exames de rotina na avaliação das pessoas que têm pressão alta. Além disso, serão feitos um eletrocardiograma rotineiro e poderá ser solicitado também um ecocardiograma (ultrassom do coração). Serão feitos exames especiais de avaliação da frequência do seu coração por 20 minutos com o uso do aparelho de eletrocardiograma. No seu sangue, mediremos alguns hormônios que são responsáveis pelo aumento da pressão. Uma amostra do seu sangue e do DNA (material genético) que será coletado de seu sangue deverão ser congelados e armazenados no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração – HCFMUSP, sob responsabilidade do diretor deste Laboratório, para possíveis análises futuras, que somente serão realizadas com o seu consentimento.

3 – Os desconfortos que esses exames podem acarretar são: dor na hora de tirar sangue da veia do braço, pequeno sangramento no local da picada da agulha, gasto de seu tempo para a realização dos seus exames. Não há riscos maiores para esses exames. Com o tratamento da sua pressão, poderá haver no início do tratamento alguma sonolência e, em alguns casos, tonturas. Mas esses sintomas estão relacionados à diminuição da sua pressão, e desaparecem num prazo de 10 dias de tratamento, até que o seu organismo se acostume com a pressão arterial mais baixa (em níveis normais).

4 – Com o tratamento da sua pressão por este estudo haverá diminuição nos riscos de derrame cerebral e de infarto do coração, e também diminuição de riscos de problemas nos rins, que podem ocorrer quando não há controle adequado da pressão arterial. Um outro benefício deste estudo, que atingirá toda a população brasileira, será a possibilidade de padronização da assistência farmacêutica futura do Ministério da Saúde do governo brasileiro.

5 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr.

..... que pode ser encontrado no endereço:

....., telefone(s):.....

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) através do(s) fone(s):....., e-mail: ou endereço:

6 – É garantida a sua liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento, portanto você poderá deixar de participar deste estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

7 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas de seus exames e consultas serão analisadas juntamente com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

8 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas. Você poderá questionar sobre os resultados deste estudo que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

9 – Não há custos pelo tratamento, consultas, exames e medicação. Também não há compensação financeira, e nenhum tipo de pagamento ou remuneração relacionado à sua participação no estudo;

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Estudo Multicêntrico de pacientes com hipertensão arterial para identificação de pacientes resistentes e padronização de esquemas terapêuticos".

Eu discuti com o Dr. sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

O (a) sr.(a) concorda que uma amostra de sangue e do DNA do seu sangue sejam congelados e armazenados para exames genéticos futuros?

Sim ()

Não ()

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

8. Referências

1. Lloyd-Jones, D. M.; Larson, M. G.; Beiser, A.; Levy, D. Lifetime risk of developing coronary heart disease, *Lancet*. 1999, 353, 89-92.
2. Yang, H. C.; Chang, L. C.; Liang, Y. J.; Lin, C. H.; Wang, P. L. A genome-wide homozygosity association study identifies runs of homozygosity associated with rheumatoid arthritis in the human major histocompatibility complex, *PLoS One*. 2012, 7, e34840.
3. Silva, P. S.; Fontana, V.; Luizon, M. R., et al. eNOS and BDKRB2 genotypes affect the antihypertensive responses to enalapril, *Eur J Clin Pharmacol*. 2013, 69, 167-177.
4. (NCD-RisC), N. R. F. C. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants, *Lancet*. 2017, 389, 37-55.
5. Malta, D. C.; Stopa, S. R.; Canuto, R., et al. Self-reported prevalence of disability in Brazil, according to the National Health Survey, 2013, *Cien Saude Colet*. 2016, 21, 3253-3264.
6. Lim, S. S.; Vos, T.; Flaxman, A. D., et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet*. 2012, 380, 2224-2260.
7. Macinko, J.; Leventhal, D. G. P.; Lima-Costa, M. F. Primary Care and the Hypertension Care Continuum in Brazil, *J Ambul Care Manage*. 2018, 41, 34-46.
8. Picon, R. V.; Fuchs, F. D.; Moreira, L. B.; Riegel, G.; Fuchs, S. C. Trends in prevalence of hypertension in Brazil: a systematic review with meta-analysis, *PLoS One*. 2012, 7, e48255.

9. Malachias, M. V. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Presentation, Arq Bras Cardiol. 2016, 107, 0.
10. Cardiologia, S. B. d.; Hipertensão, S. B. d.; Nefrologia, S. B. d. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension], Arq Bras Cardiol. 2010, 95, 1-51.
11. Mancia, G.; Sega, R.; Bravi, C., et al. Ambulatory blood pressure normality: results from the PAMELA study, J Hypertens. 1995, 13, 1377-1390.
12. Franklin, S. S.; Jacobs, M. J.; Wong, N. D.; L'Italien, G. J.; Lapuerta, P. Predominance of isolated systolic hypertension among middle-aged and elderly US hypertensives: analysis based on National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III, Hypertension. 2001, 37, 869-874.
13. Kikuya, M.; Hansen, T. W.; Thijs, L., et al. Diagnostic thresholds for ambulatory blood pressure monitoring based on 10-year cardiovascular risk, Circulation. 2007, 115, 2145-2152.
14. Bidlingmeyer, I.; Burnier, M.; Bidlingmeyer, M.; Waeber, B.; Brunner, H. R. Isolated office hypertension: a prehypertensive state?, J Hypertens. 1996, 14, 327-332.
15. Mancia, G.; Bombelli, M.; Facchetti, R., et al. Long-term risk of sustained hypertension in white-coat or masked hypertension, Hypertension. 2009, 54, 226-232.
16. Pickering, T. G.; Davidson, K.; Gerin, W.; Schwartz, J. E. Masked hypertension, Hypertension. 2002, 40, 795-796.
17. Parati, G.; Stergiou, G. S.; Asmar, R., et al. European Society of Hypertension guidelines for blood pressure monitoring at home: a summary report of the Second International Consensus Conference on Home Blood Pressure Monitoring, J Hypertens. 2008, 26, 1505-1526.

18. Krieger, E. M.; Drager, L. F.; Giorgi, D. M., et al. Resistant hypertension optimal treatment trial: a randomized controlled trial, *Clin Cardiol.* 2014, 37, 1-6.
19. Judd, E.; Calhoun, D. A. Apparent and true resistant hypertension: definition, prevalence and outcomes, *J Hum Hypertens.* 2014, 28, 463-468.
20. Alessi, A.; Brandão, A. A.; Coca, A., et al. First Brazilian position on resistant hypertension, *Arq Bras Cardiol.* 2012, 99, 576-585.
21. Malachias, M. V. B.; Rodrigues, C. I.; Muxfeldt, E.; Salles, G. F.; Moreno, H.; Gus, M. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 13 - Resistant Arterial Hypertension, *Arq Bras Cardiol.* 2016, 107, 75-78.
22. Calhoun, D. A.; Jones, D.; Textor, S., 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, e510-526.
23. Cushman, W. C.; Ford, C. E.; Cutler, J. A., et al. Success and predictors of blood pressure control in diverse North American settings: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT), *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2002, 4, 393-404.
24. de Faria, A. P.; Modolo, R.; Fontana, V.; Moreno, H. Adipokines: novel players in resistant hypertension, *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2014, 16, 754-759.
25. Investigators, R. Resistant hypertension optimal treatment trial: a randomized controlled trial, *Clin Cardiol.* 2014, 37, 1-6.
26. Burnier, M.; Vuignier, Y.; Wuerzner, G. State-of-the-art treatment of hypertension: established and new drugs, *Eur Heart J.* 2013.

27. Gitt, A. K.; Baumgart, P.; Bramlage, P., et al. EARLY Treatment with azilsartan compared to ACE-inhibitors in anti-hypertensive therapy--rationale and design of the EARLY hypertension registry, *BMC Cardiovasc Disord.* 2013, 13, 46.
28. Kanno, Y.; Okada, H.; Yamaji, Y.; Nakazato, Y.; Suzuki, H. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors slow renal decline in IgA nephropathy, independent of tubulointerstitial fibrosis at presentation, *QJM.* 2005, 98, 199-203.
29. Cagnoni, F.; Njwe, C. A.; Zaninelli, A., et al. Blocking the RAAS at different levels: an update on the use of the direct renin inhibitors alone and in combination, *Vasc Health Risk Manag.* 2010, 6, 549-559.
30. Abrahamian, H.; Prager, R. [Reduction of cardiovascular morbidity and mortality by combined antihypertensive drug therapy in patients with type 2 diabetes mellitus], *Wien Med Wochenschr.* 2002, 152, 210-214.
31. Zornoff, L. A.; Paiva, S. A.; Matsubara, B. B.; Matsubara, L. S.; Spadaro, J. Combination therapy with angiotensin converting enzyme inhibition and AT1 receptor inhibitor on ventricular remodeling after myocardial infarction in rats, *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2000, 5, 203-209.
32. Chandra, K. S.; Ramesh, G. The fourth-generation Calcium channel blocker: Cilnidipine, *Indian Heart J.* 2013, 65, 691-695.
33. Elliott, W. J.; Ram, C. V. Calcium channel blockers, *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2011, 13, 687-689.
34. Griffin, J. L.; Atherton, H.; Shockcor, J.; Atzori, L. Metabolomics as a tool for cardiac research, *Nat Rev Cardiol.* 2011, 8, 630-643.

35. Huo, T.; Cai, S.; Lu, X.; Sha, Y.; Yu, M.; Li, F. Metabonomic study of biochemical changes in the serum of type 2 diabetes mellitus patients after the treatment of metformin hydrochloride, *J Pharm Biomed Anal.* 2009, 49, 976-982.
36. Klawitter, J.; Haschke, M.; Kahle, C.; Dingmann, C.; Leibfritz, D.; Christians, U. Toxicodynamic effects of ciclosporin are reflected by metabolite profiles in the urine of healthy individuals after a single dose, *Br J Clin Pharmacol.* 2010, 70, 241-251.
37. Sussulini, A.; Prando, A.; Maretto, D. A., et al. Metabolic profiling of human blood serum from treated patients with bipolar disorder employing ^1H NMR spectroscopy and chemometrics, *Anal Chem.* 2009, 81, 9755-9763.
38. van Doorn, M.; Vogels, J.; Tas, A., et al. Evaluation of metabolite profiles as biomarkers for the pharmacological effects of thiazolidinediones in Type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers, *Br J Clin Pharmacol.* 2007, 63, 562-574.
39. Krauss, R. M.; Zhu, H.; Kaddurah-Daouk, R. Pharmacometabolomics of statin response, *Clin Pharmacol Ther.* 2013, 94, 562-565.
40. Trupp, M.; Zhu, H.; Wikoff, W. R., et al. Metabolomics reveals amino acids contribute to variation in response to simvastatin treatment, *PLoS One.* 2012, 7, e38386.
41. Wikoff, W. R.; Frye, R. F.; Zhu, H., et al. Pharmacometabolomics reveals racial differences in response to atenolol treatment, *PLoS One.* 2013, 8, e57639.

42. Mersha, T. B.; Abebe, T. Self-reported race/ethnicity in the age of genomic research: its potential impact on understanding health disparities, *Hum Genomics*. 2015, 9, 1.
43. Tate, S. K.; Goldstein, D. B. Will tomorrow's medicines work for everyone?, *Nat Genet*. 2004, 36, S34-42.
44. Luzum, J. A.; Peterson, E.; Li, J., et al. Race and Beta-Blocker Survival Benefit in Patients With Heart Failure: An Investigation of Self-Reported Race and Proportion of African Genetic Ancestry, *J Am Heart Assoc*. 2018, 7.
45. Pei, Z.; Liu, J.; Liu, M., et al. Risk-Predicting Model for Incident of Essential Hypertension Based on Environmental and Genetic Factors with Support Vector Machine, *Interdiscip Sci*. 2018.
46. Persell, S. D. Prevalence of resistant hypertension in the United States, 2003-2008, *Hypertension*. 2011, 57, 1076-1080.
47. Daugherty, S. L.; Powers, J. D.; Magid, D. J., et al. Incidence and prognosis of resistant hypertension in hypertensive patients, *Circulation*. 2012, 125, 1635-1642.
48. Wei, F. F.; Zhang, Z. Y.; Huang, Q. F.; Staessen, J. A. Diagnosis and management of resistant hypertension: state of the art, *Nat Rev Nephrol*. 2018.
49. Jones, E. S.; Spence, J. D.; McIntyre, A. D., et al. High Frequency of Variants of Candidate Genes in Black Africans with Low Renin-Resistant Hypertension, *Am J Hypertens*. 2017, 30, 478-483.
50. Yaméogo, N. V.; Samadoulougou, A. K.; Kagambèga, L. J., et al. [Epidemiological characteristics and clinical features of black African subject's resistant hypertension], *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2014, 63, 83-88.

51. Sim, J. J.; Bhandari, S. K.; Shi, J., et al. Characteristics of resistant hypertension in a large, ethnically diverse hypertension population of an integrated health system, *Mayo Clin Proc.* 2013, 88, 1099-1107.
52. Padmanabhan, S.; Joe, B. Towards Precision Medicine for Hypertension: A Review of Genomic, Epigenomic, and Microbiomic Effects on Blood Pressure in Experimental Rat Models and Humans, *Physiol Rev.* 2017, 97, 1469-1528.
53. James, P. A.; Oparil, S.; Carter, B. L., et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8), *JAMA.* 2014, 311, 507-520.
54. Whelton, P. K.; Carey, R. M.; Aronow, W. S., et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines, *Hypertension.* 2018, 71, e13-e115.
55. Bortolotto, L. A.; Midlej-Brito, T.; Pisani, C.; Costa-Hong, V.; Scanavacca, M. Renal denervation by ablation with innovative technique in resistant hypertension, *Arq Bras Cardiol.* 2013, 101, e77-79.
56. Kumbhani, D. J.; Steg, P. G.; Cannon, C. P., et al. Resistant hypertension: a frequent and ominous finding among hypertensive patients with atherothrombosis, *Eur Heart J.* 2013, 34, 1204-1214.
57. Sarafidis, P. A. Epidemiology of resistant hypertension, *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2011, 13, 523-528.

58. Gonçalves, V. F.; Carvalho, C. M.; Bortolini, M. C.; Bydlowski, S. P.; Pena, S. D. The phylogeography of African Brazilians, *Hum Hered.* 2008, 65, 23-32.
59. Pena, S. D.; Di Pietro, G.; Fuchshuber-Moraes, M., et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected, *PLoS One.* 2011, 6, e17063.
60. Marini, S.; Lena, U. K.; Crawford, K. M., et al. Comparison of Genetic and Self-Identified Ancestry in Modeling Intracerebral Hemorrhage Risk, *Front Neurol.* 2018, 9, 514.
61. Zhang, X.; Mu, W.; Liu, C.; Zhang, W. Ancestry-informative markers for African Americans based on the Affymetrix Pan-African genotyping array, *PeerJ.* 2014, 2, e660.
62. Barbosa, A. F.; Barbosa, V. M.; Bettini, J.; Luccas, P. O.; Figueiredo, E. C. Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis, *Talanta.* 2015, 131, 213-220.
63. Santos, H. C.; Horimoto, A. V.; Tarazona-Santos, E., et al. A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: the Brazilian set, *Eur J Hum Genet.* 2016, 24, 725-731.
64. Alexander, D. H.; Novembre, J.; Lange, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals, *Genome Res.* 2009, 19, 1655-1664.
65. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Accessed 01/31/2018 2018.
66. Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K., et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses, *Am J Hum Genet.* 2007, 81, 559-575.

67. Krieger, E. M.; Drager, L. F.; Giorgi, D. M. A., et al. Spironolactone Versus Clonidine as a Fourth-Drug Therapy for Resistant Hypertension: The ReHOT Randomized Study (Resistant Hypertension Optimal Treatment), *Hypertension*. 2018, 71, 681-690.
68. Shimizu, T.; Mori, T.; Tomita, M.; Tsumoto, K. pH switching that crosses over the isoelectric point (pI) can improve the entrapment of proteins within giant liposomes by enhancing protein-membrane interaction, *Langmuir*. 2014, 30, 554-563.
69. de Faria, H. D.; Rosa, M. A.; Silveira, A. T.; Figueiredo, E. C. Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system, *Food Chem*. 2017, 225, 98-106.
70. Barbosa, V. M.; Barbosa, A. F.; Bettini, J.; Luccas, P. O.; Figueiredo, E. C. Direct extraction of lead (II) from untreated human blood serum using restricted access carbon nanotubes and its determination by atomic absorption spectrometry, *Talanta*. 2016, 147, 478-484.
71. Dos Santos, R. C.; Kakazu, A. K.; Santos, M. G.; Belinelli Silva, F. A.; Figueiredo, E. C. Characterization and application of restricted access carbon nanotubes in online extraction of anticonvulsant drugs from plasma samples followed by liquid chromatography analysis, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2017, 1054, 50-56.
72. Gomes, R. A. B.; Lucca, P. O.; Magalhães, C. S.; Figueiredo, E. C. Evaluation of the pH influence on protein exclusion by restricted access carbon nanotubes coated with bovine serum albumin *In J Mater Sci*). 2016.

73. Dong, H.; Xu, F.; Zhang, Z.; Tian, Y.; Chen, Y. Simultaneous determination of spironolactone and its active metabolite canrenone in human plasma by HPLC-APCI-MS, *J Mass Spectrom.* 2006, 41, 477-486.
74. Gonzalez, O.; Iriarte, G.; Rico, E., et al. LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010, 878, 2685-2692.
75. Neerland, B. E.; Hov, K. R.; Bruun Wyller, V., et al. The protocol of the Oslo Study of Clonidine in Elderly Patients with Delirium; LUCID: a randomised placebo-controlled trial, *BMC Geriatr.* 2015, 15, 7.
76. Kim, B. H.; Kim, J. R.; Kim, M. G., et al. Pharmacodynamic (hemodynamic) and pharmacokinetic comparisons of S-amlodipine gentisate and racemate amlodipine besylate in healthy Korean male volunteers: two double-blind, randomized, two-period, two-treatment, two-sequence, double-dummy, single-dose crossover studies, *Clin Ther.* 2010, 32, 193-205.
77. Schulz, M.; Iwersen-Bergmann, S.; Andresen, H.; Schmoldt, A. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics, *Crit Care.* 2012, 16, R136.
78. Lv, C.; Wei, C.; Wang, X., et al. The influence of food on the pharmacokinetics of amlodipine and losartan after single-dose of its compound tablets in healthy chinese subjects, *Drug Res (Stuttg).* 2014, 64, 229-235.
79. Moen, M. D.; Wagstaff, A. J. Losartan: a review of its use in stroke risk reduction in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy, *Drugs.* 2005, 65, 2657-2674.

80. BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, New York, 2005.
81. Zhang, Z. X.; Gao, X. Y. [Research on pharmacometabolomics], Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2018, 43, 1093-1098.
82. de Faria, H. D.; Abrão, L. C.; Santos, M. G.; Barbosa, A. F.; Figueiredo, E. C. New advances in restricted access materials for sample preparation: A review, Anal Chim Acta. 2017, 959, 43-65.
83. Josefsson, M.; Norlander, B. Coupled-column chromatography on a Chiral-AGP phase for determination of amlodipine enantiomers in human plasma: an HPLC assay with electrochemical detection, J Pharm Biomed Anal. 1996, 15, 267-277.
84. Nirogi, R.; Kandikere, V.; Mudigonda, K.; Komarneni, P. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of clonidine with LLOQ of 10 pg/mL in human plasma, Biomed Chromatogr. 2008, 22, 992-1000.
85. Ramusovic, S.; Thielking, G.; Läer, S. Determination of enalapril and enalaprilat in small human serum quantities for pediatric trials by HPLC-tandem mass spectrometry, Biomed Chromatogr. 2012, 26, 697-702.
86. Garcia-Ac, A.; Segura, P. A.; Gagnon, C.; Sauvé, S. Determination of bezafibrate, methotrexate, cyclophosphamide, orlistat and enalapril in waste and surface waters using on-line solid-phase extraction liquid chromatography coupled to polarity-switching electrospray tandem mass spectrometry, J Environ Monit. 2009, 11, 830-838.
87. Lee, H.; Shim, H. O.; Lee, H. S. Simultaneous Determination of Losartan and Active Metabolite

EXP3174 in Rat Plasma by HPLC with Column Switching. In Chromatographia).
1996.

88. Park, J. E.; Jeong, G. H.; Lee, I. K., et al. A Pharmacometabolomic Approach to Predict Response to Metformin in Early-Phase Type 2 Diabetes Mellitus Patients, *Molecules*. 2018, 23.

89. Rotroff, D. M.; Oki, N. O.; Liang, X., et al. Pharmacometabolomic Assessment of Metformin in Non-diabetic, African Americans, *Front Pharmacol*. 2016, 7, 135.

90. Elbadawi-Sidhu, M.; Baillie, R. A.; Zhu, H., et al. Pharmacometabolomic signature links simvastatin therapy and insulin resistance, *Metabolomics*. 2017, 13.

91. Nam, H. W.; Karpyak, V. M.; Hinton, D. J., et al. Elevated baseline serum glutamate as a pharmacometabolomic biomarker for acamprosate treatment outcome in alcohol-dependent subjects, *Transl Psychiatry*. 2015, 5, e621.

92. Baranowska, I.; Wilczek, A.; Baranowski, J. Rapid UHPLC method for simultaneous determination of vancomycin, terbinafine, spironolactone, furosemide and their metabolites: application to human plasma and urine, *Anal Sci*. 2010, 26, 755-759.

93. Herráez-Hernández, R.; Soriano-Vega, E.; Campíns-Falcó, P. High-performance liquid chromatographic determination of spironolactone and its major metabolite canrenone in urine using ultraviolet detection and column-switching, *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1994, 658, 303-310.

94. De Nicolò, A.; Avataneo, V.; Rabbia, F., et al. UHPLC-MS/MS method with protein precipitation extraction for the simultaneous quantification of ten

antihypertensive drugs in human plasma from resistant hypertensive patients, J Pharm Biomed Anal. 2016, 129, 535-541.

95. Magiera, S.; Baranowska, I. A new and fast strategy based on semiautomatic microextraction by packed sorbent followed by ultra high performance liquid chromatography for the analysis of drugs and their metabolites in human urine, J Sep Sci. 2014, 37, 3314-3315.

96. Fagundes, V. F.; Leite, C. P.; Pianetti, G. A.; Fernandes, C. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2014, 947-948, 8-16.

97. Yamamoto, E.; Hyodo, K.; Ohnishi, N., et al. Direct, simultaneous measurement of liposome-encapsulated and released drugs in plasma by on-line SPE-SPE-HPLC, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2011, 879, 3620-3625.

98. de Lima, M. M.; Vieira, A. C.; Martins, I.; Boralli, V. B.; Borges, K. B.; Figueiredo, E. C. On-line restricted access molecularly imprinted solid phase extraction of ivermectin in meat samples followed by HPLC-UV analysis, Food Chem. 2016, 197, 7-13.

99. da Silva, K. K.; Boralli, V. B.; Wisniewski, C.; Figueiredo, E. C. On-Line Restricted Access Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Directly from Untreated Human Plasma Samples Followed by HPLC-UV Analysis, J Anal Toxicol. 2016, 40, 108-116.

100. Hoshina, K.; Horiyama, S.; Matsunaga, H.; Haginaka, J. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water samples by

liquid chromatography-tandem mass spectrometry using molecularly imprinted polymers as a pretreatment column, *J Pharm Biomed Anal.* 2011, 55, 916-922.

101. Franceschini, N.; Reiner, A. P.; Heiss, G. Recent findings in the genetics of blood pressure and hypertension traits, *Am J Hypertens.* 2011, 24, 392-400.

102. Steptoe, A.; Hamer, M.; O'Donnell, K.; Venuraju, S.; Marmot, M. G.; Lahiri, A. Socioeconomic status and subclinical coronary disease in the Whitehall II epidemiological study, *PLoS One.* 2010, 5, e8874.

103. Bernardez-Pereira, S.; Gioli-Pereira, L.; Marcondes-Braga, F. G., et al. Genomic ancestry as a predictor of haemodynamic profile in heart failure, *Open Heart.* 2016, 3, e000434.

104. Rolim, H.; Cronemberger, S.; Rangel, H.; Batista, W. D.; Bastos-Rodrigues, L.; De Marco, L. The Role of Genetic Ancestry in Brazilian Patients With Primary Congenital Glaucoma, *J Glaucoma.* 2016, 25, e24-28.

105. Mukhtar, O.; Cheriyan, J.; Cockcroft, J. R., et al. A randomized controlled crossover trial evaluating differential responses to antihypertensive drugs (used as mono- or dual therapy) on the basis of ethnicity: The comparIsoN of Optimal Hypertension RegiMens; part of the Ancestry Informative Markers in HYpertension program-AIM-HY INFORM trial, *Am Heart J.* 2018, 204, 102-108.

106. Calhoun, D. A.; Nishizaka, M. K.; Zaman, M. A.; Thakkar, R. B.; Weissmann, P. Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension, *Hypertension.* 2002, 40, 892-896.

107. Muntner, P.; Davis, B. R.; Cushman, W. C., et al. Treatment-resistant hypertension and the incidence of cardiovascular disease and end-stage renal disease: results from the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT), *Hypertension.* 2014, 64, 1012-1021.

108. Pio-Abreu, A.; Drager, L. F. Resistant Hypertension: Time to Consider the Best Fifth Anti-Hypertensive Treatment, *Curr Hypertens Rep.* 2018, 20, 67.