CAROLINA DE CAMPOS GONZAGA

Avaliação dos efeitos da apneia obstrutiva do sono sobre a pressão arterial, metabolismos glicídico e lipídico, e marcadores inflamatórios em pacientes hipertensos

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Entidade Associada da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

CAROLINA DE CAMPOS GONZAGA

Avaliação dos efeitos da apneia obstrutiva do sono sobre a pressão arterial, metabolismos glicídico e lipídico, e marcadores inflamatórios em pacientes hipertensos

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Entidade Associada da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Celso Amodeo
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Chiara Bertolami

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

©reprodução autorizada pelo autor

Gonzaga, Carolina de Campos

Avaliação dos efeitos da apneia obstrutiva do sono sobre a pressão arterial, metabolismos glicídico e lipídico, e marcadores inflamatórios em pacientes hipertensos. / Carolina de Campos Gonzaga — São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Universidade de São Paulo
Área de Concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Celso Amodeo

Descritores: 1. Apneia do Sono Tipo Obstrutiva. 2. Pressão Arterial. 3. Hipertensão. 4. Inflamação.

USP/IDPC/Biblioteca/036 /14

Dedicatória

Aos meus pais, Jonas e Deoty, a quem devo tudo que sou,

que me ensinaram o valor do trabalho, da ética, da moral,

sempre com tanto Amor.

Ao meu querido marido Rafael, que suportou ao meu lado a caminhada,

fazendo com que tudo tivesse sentido, completando-me.

À minha irmã Marina, que compartilhando das dificuldades

me fez ver a vida com mais gratidão e alegria.

Agradecimentos

Aos Pacientes, pela paciência e disponibilidade.

À Diretoria do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
pela confiança e por todo o suporte ao Laboratório do Sono.

Ao Dr. Celso Amodeo, por todas as oportunidades de aprendizado,
e pela grande colaboração na minha formação profissional e pessoal.

Ao Dr. Marcelo Bertolami, pelo comprometimento,
humildade e integridade inspiradores.

À Dra. Adriana Bertolami, por acreditar e
colaborar incondicionalmente.

À Dra. Ângela T. Paes, pela dedicação e comprometimento ímpares,
que iluminaram não somente a Estatística.

À Juliana Lourenço da Silva, pela dedicação e preciosa colaboração.

À Laura Muramatu, pelo comprometimento e
carinho com o Laboratório do Sono e pacientes.

Ao Enf. José Carlos Silva e companheiros da MAPA,

pela dedicação e grande colaboração.

À Anna Simene e equipe da Biblioteca

pela eficiência e enorme contribuição.

À Valquíria Dias e Janeide Santos pela atenção e

companheirismo nestes anos de trabalho conjunto.

Aos colegas da Seção de Hipertensão Arterial e Nefrologia

pela paciência e apoio.

À Dra. Aline Corá e equipe do Laboratório Clínico

pela disposição e grande trabalho.

À Dra. Simone Arazi por ter me inspirado a acreditar no sonho,

e à atual equipe da Biologia Molecular pela grande colaboração.

Aos queridos amigos por suportarem as ausências e angústias,

e pelos momentos de alegria proporcionados neste ínterim.

À Dra. Eliana Curátolo, pelo exemplo profissional e pessoal,

por me ensinar "a pescar" e a ver a vida mais colorida.

E finalmente, mas de infinita importância, a "Nosso Pai Maior",

por tudo.

“Não importa o que fizeram com você. O que importa é o que você faz com aquilo que fizeram com você.”

Jean-Paul Sartre

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Lista de Gráficos
Resumo
Abstract
1 INTRODUÇÃO ---------- 01
1.1 Hipertensão arterial ---------- 02
1.2 Apneia obstrutiva do sono ---------- 04
1.2.1 Mecanismos fisiopatológicos da apneia obstrutiva do sono ---------- 06
1.2.2 Apneia obstrutiva do sono e comorbidades cardiovasculares ---------- 10
1.3 Polimorfismos genéticos ---------- 12
1.4 Expressão gênica ---------- 14
2 HIPÓTESE ---------- 15
3 OBJETIVOS ---------- 17
3.1 Primário ---------- 18
3.2 Secundários ---------- 18
4 CASUÍSTICA ---------- 19
4.1 População ---------- 20
4.2 Delineamento do estudo ---------- 21
4.3 Critérios de inclusão ---------- 22
4.4 Critérios de exclusão ---------- 22
4.5 Critérios de interrupção do estudo ---------- 24
5 MÉTODOS ---------- 25
5.1 Avaliação clínica ---------- 26
5.2 Amostras biológicas ---------- 29
5.3 Determinação dos parâmetros laboratoriais ---------- 29
5.4 Avaliação do sono ---------- 31
5.4.1 Estratificação de risco para apneia ---------- 31
5.4.2 Polissonografia ---------- 32
5.5 Monitorização ambulatorial da pressão arterial ---------- 35
5.6 Análise da pressão central ---------- 36
5.7 Utilização das técnicas de biologia molecular ---------- 38
5.7.1 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico -- 38
5.7.2 Determinação dos single nucleotide polymorphisms (SNPs) por pirosequenciamento ---------- 38
5.7.3 Avaliação dos polimorfismos por pirosequenciamento e análise do tamanho de fragmento de restrição ---------- 40
5.7.4 Extração de ácido ribonucleico (RNA) de sangue periférico ---------- 41
5.7.5 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real ----- 41
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA ---------- 44

7 ASPECTOS ÉTICOS E FINANCIAMENTO ---------- 48
8 RESULTADOS ---------- 50
8.1 Caracterização da amostra - comparações entre pacientes com e sem hipertensão arterial resistente ---------- 51
8.2 A apneia obstrutiva do sono nos pacientes hipertensos ---------- 59
8.3 Efeito da apneia sobre o controle da pressão arterial, metabolismos glicídico e lipídico, e atividade inflamatória ---------- 62
8.3.1 Efeito da apneia sobre a pressão arterial ---------- 65
8.3.2 Efeito da apneia sobre o metabolismo glicídico e lipídico ---------- 68
8.3.3 Efeito da apneia sobre a atividade inflamatória ---------- 69
8.4 Análise dos polimorfismos genéticos ---------- 73
8.4.1 Polimorfismos genéticos nos hipertensos resistentes e não resistentes ---------- 73
8.4.2 Polimorfismos genéticos de acordo com a classificação da apneia ---------- 75
8.5 Avaliação da expressão de mRNA e a presença de hipertensão arterial resistente ---------- 76
9 DISCUSSÃO ---------- 77
9.1 A hipertensão arterial resistente ---------- 78
9.2 A apneia obstrutiva do sono ---------- 81
9.2.1 A apneia obstrutiva do sono e seus efeitos na pressão arterial, metabolismos glicídico e lipídico, e atividade inflamatória ---------- 82
9.3 Genética ---------- 85
10 CONCLUSÃO ---------- 87
11 ANEXOS ---------- 89
12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ---------- 100

Listas

Lista de Abreviaturas

ACC	antagonista dos canais de cálcio
ACE	*angiotensin I converting enzyme* (enzima conversora de angiotensina)
ADD1	*adducin 1* (*alpha*) (alfa-aducina)
AF	antecedente familiar
AGT	*angiotensinogen* (angiotensinogênio)
AGTR1	*angiotensin II receptor, type 1* (receptor tipo 1 da angiotensina II)
AIT	ataque isquêmico transitório
Aldo/ARP	relação aldosterona / atividade da renina plasmática
ANCOVA	análise de covariância
ANOVA	análise de variância
AOS	apneia obstrutiva do sono
Apo A1	apolipoproteína A1
Apo B	apolipoproteína B
ARP	atividade da renina plasmática
AVC	acidente vascular cerebral
BNP	peptídeo natriurético tipo B
Body	posição do corpo
BRA	bloqueador do receptor da angiotensina
c10orf107	*chromosome 10 open reading frame 107*
C3M2, C4M1	canais do eletroencefalograma
CA	circunferência abdominal
CC	circunferência cervical
cDNA	complemento do ácido desoxirribonucleico
Chin EMG e EMG1	eletromiograma da região do mento
CQ	circunferência do quadril
CYP11B2	*cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2*
CYP17A1	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1
CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2
DAC	doença arterial coronária
DM	*diabetes mellitus* tipo II
DNA	ácido desoxirribonucleico
ECG 1	eletrocardiograma – registro da polissonografia
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos

F3M2, F4M1	canais do eletroencefalograma
FGF5	*fibroblast growth factor 5*
Flow	curva do fluxo respiratório pelo termistor
grupo HAR	grupo com hipertensão arterial resistente
grupo não-HAR	grupo sem hipertensão arterial resistente
HAR	hipertensão arterial resistente
HbA1C	hemoglobina glicada
HIF-1	fator de transcrição *hypoxia-inducible factor-1*
HOMA B	*Homeostasis Model Assesment Beta*
HOMA IR	*Homeostasis Model Assesment IR*
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IAH	índice de apneia e hipopneia
IAPC	insuficiência arterial periférica crônica
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IECA	inibidor da enzima conversora da angiotensina
IFCC	*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*
IMC	índice de massa corpórea
LEG1 e LEG2	movimento de membros inferiores
LEOG	eletro-oculograma esquerdo
MAPA	monitorização ambulatorial da pressão arterial
Medicação HA	número de fármacos anti-hipertensivos em uso
Micro	microfone
Mod	moderada
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MTHFR	*methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)*
NPPA	*natriuretic peptide A*
O1M2, O2M1	canais do eletroencefalograma
O_2	oxigênio
PA	pressão arterial
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCR-us	proteína C reativa ultrassensível
PFlow	curva do fluxo respiratório pela cânula de pressão nasal
PLCD3	*phospholipase C, delta 3*
PLM	movimentos periódicos dos membros
REM	*Rapid Eye Movement*
REOG	eletro-oculograma direito
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase

RVS	resistência vascular sistêmica
SNP	*single nucleotide polymorphism*
SpO2	saturação da oxi-hemoglobina
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TFG	taxa de filtração glomerular calculada pela fórmula de Cockcroft-Gault
THO e ABD	curva de expansibilidade do tórax e abdome
TSH	hormônio tireoestimulante
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VOP	velocidade da onda de pulso
vs	*versus*
ZNF652	*zinc finger protein 652*
↑	aumento
↓	diminuição

Lista de Figuras

Figura 1 - Anatomia orofaríngea. Durante o sono ocorre relaxamento da musculatura, com bloqueio parcial ou total da passagem de ar na faringe, incluindo tipicamente a região posterior da úvula e/ou parte posterior da língua, correspondendo a naso e orofaringe, respectivamente[24] ---------- 07

Figura 2 - Potenciais mecanismos pelos quais a apneia obstrutiva do sono influencia a hipertensão[28] ---------- 09

Figura 3 - Fluxograma do estudo ---------- 22

Figura 4 - Polissonígrafo Alice 5 (Respironics - Royal Philips, Holanda) e paciente após o preparo para exame de polissonografia[90] ---------- 33

Figura 5 - Trecho de tela de aquisição do exame de polissonografia -- 34

Figura 6 - SphygmoCor (AtCor Medical, West Ryde, Austrália) --------- 37

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Doenças cardiovasculares associadas à apneia obstrutiva do sono[5,16] ---------- 11
Tabela 2 - Metodologia das análises laboratoriais ---------- 30
Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes ---------- 52
Tabela 4 - Pressão arterial no consultório e pela MAPA dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes ---------- 53
Tabela 5 - Análise da pressão arterial central dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes ---------- 53
Tabela 6 - Características metabólicas dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes ---------- 56
Tabela 7 - Perfil inflamatório, renal e hormonal dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes ---------- 57
Tabela 8 - Avaliação do sono dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes ---------- 59
Tabela 9 - Características clínicas dos pacientes de acordo com a classificação da apneia ---------- 64
Tabela 10 - Pressão arterial (em mm Hg) no consultório e pela MAPA dos pacientes de acordo com a classificação da apneia ---------- 66
Tabela 11 - Efeito da apneia sobre a pressão arterial diastólica medida pela monitorização arterial da pressão arterial nas 24 horas, na vigília e no sono ---------- 67
Tabela 12 - Análise da pressão arterial central dos pacientes de acordo com a classificação da apneia ---------- 68
Tabela 13 - Características metabólicas dos pacientes hipertensos de acordo com a classificação da apneia ---------- 69
Tabela 14 - Perfil inflamatório, renal e hormonal dos pacientes hipertensos de acordo com a classificação da apneia ---------- 70
Tabela 15 - Frequência (%) dos genótipos nos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes ---------- 74
Tabela 16 - Frequência (%) dos genótipos de acordo com a classificação da apneia obstrutiva do sono ---------- 75

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Prevalência de causas secundárias de hipertensão associadas à resistência ao tratamento anti-hipertensivo --- 41
Gráfico 2 - Fármacos anti-hipertensivos em uso pelos pacientes resistentes e não resistentes ---------- 42
Gráfico 3 - Fármacos não anti-hipertensivos em uso pelos pacientes resistentes e não resistentes---------- 42
Gráfico 4 - Distribuição dos pacientes de acordo com índice de apneia e hipopneia ---------- 43
Gráfico 5 - Distribuição dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes quanto à classificação da apneia (p = 0,242 para as comparações entre os dois grupos)---------- 43
Gráfico 6 - Ácido úrico de acordo com a classificação da apneia - Intervalos de confiança de 95% para as médias ---------- 44
Gráfico 7 - C3 de acordo com a classificação da apneia - Intervalos de confiança de 95% para as médias ---------- 44
Gráfico 8 - C4 de acordo com a classificação da apneia - Intervalos de confiança de 95% para as médias ---------- 44
Gráfico 9 - Características clínicas dos pacientes de acordo com a classificação da apneia---------- 44

RESUMO

Gonzaga CC. **Avaliação dos efeitos da apneia obstrutiva do sono sobre a pressão arterial, metabolismos glicídico e lipídico, e marcadores inflamatórios em pacientes hipertensos** [tese]. São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Entidade Associada da Universidade de São Paulo; 2014. 119p.

INTRODUÇÃO: A apneia obstrutiva do sono (AOS) é frequente em portadores de hipertensão arterial. Ambas parecem compartilhar comorbidades como obesidade, diabetes, dislipidemia e inflamação. Entretanto, o efeito da AOS sobre tais alterações, assim como o papel da genética no controle da pressão arterial (PA) ainda são discutíveis.
OBJETIVOS: Avaliar o efeito da AOS sobre a PA, metabolismos glicídico e lipídico, e atividade inflamatória em hipertensos. Comparar suas características clínicas e laboratoriais, considerando a presença de hipertensão arterial resistente (HAR) e AOS. Avaliar genes possivelmente implicados nos mecanismos fisiopatológicos de controle da PA de acordo com a presença de HAR e AOS.
MÉTODOS: Os participantes foram divididos em 2 grupos, com HAR e sem HAR (não-HAR). Avaliados em relação às suas características clínicas, sono (polissonografia), monitorização ambulatorial de pressão arterial (MAPA), laboratoriais e genéticas.
RESULTADOS: Incluídos 205 pacientes hipertensos (55,4 ± 10,1 anos), sendo 105 com HAR e 100 não-HAR. A AOS (índice de apneia e hipopneia > 15 eventos / hora) esteve presente em 34% dos HAR, sem diferença significante em relação aos não-HAR (28%). O grupo AOS grave apresentou maior proporção de homens (68%) comparados aos outros grupos de acordo com a classificação da AOS ($p < 0,05$). Pacientes com AOS grave exibiram menor descenso da PA diastólica no sono comparados aos com AOS moderada (12,4 ± 8,5 *vs*. 18,5 ± 11,5%, $p < 0,05$). Em todos os modelos que consideraram as características clínicas associadas à AOS e a HAR, concluiu-se que a AOS relacionou-se à menor PA diastólica apenas nas mulheres e em pacientes com HAR. Para o C4, os pacientes com AOS, independentemente do grau, apresentaram maiores médias do que a encontrada entre os pacientes sem AOS, mesmo após controle de variáveis ($p = 0,019$). Entre os HAR, comparado aos não-HAR, houve predomínio do sexo feminino, raça não branca, diabéticos, dislipidêmicos, e menor descenso da PA sistólica no sono. Foram encontradas maiores taxas de C4 mesmo após ajuste de variáveis no grupo HAR comparado aos não-HAR (24,4 ± 8,1 *vs.* 21,7 ± 6,9 mg/dL, $p = 0,043$). O grupo HAR apresentou maior latência do sono REM e eficiência do sono reduzida comparado ao não-HAR (146,6 ± 81,7 *vs*. 120,3 ± 70,8 min, $p = 0,016$; 73,5 ± 15,5 *vs*. 78,1 ± 11,2%, $p = 0,016$ respectivamente). Em relação às análises genéticas não foi observado resultado significante e relevante entre os polimorfismos ou na avaliação da expressão.

CONCLUSÃO: A prevalência de AOS entre pacientes hipertensos é significativa e este diagnóstico associou-se somente no sexo feminino e em pacientes com HAR a menores valores de PA diastólica quando comparados aos sem AOS. Pacientes com AOS grave apresentaram menor descenso do sono da PA diastólica e maior inflamação. Os pacientes HAR comparados aos não-HAR apresentaram maior prevalência de fatores de risco cardiovascular e pior qualidade de sono. Estudos maiores e que avaliem não somente o DNA e a expressão de mRNA, mas suas funcionalidades, são necessários para melhor definir o papel da genética na HAR e AOS.

Descritores: Apneia do sono tipo obstrutiva. Pressão arterial. Hipertensão. Inflamação.

SUMMARY

Gonzaga CC. **Effects of obstructive sleep apnea on blood pressure, glucose and lipid metabolism, and inflammatory biomarkers in hypertensive patients** [thesis]**.** São Paulo: "Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Affiliated to Universidade de São Paulo"; 2014. 119p.

BACKGROUND: Obstructive sleep apnea (OSA) is common in hypertensive patients. Both diseases seem to share comorbidities such as obesity, diabetes, dyslipidemia and inflammation. However, the effects of OSA on such alterations as well as the role of genetics in controlling blood pressure (BP) are still an arguable issue.

OBJECTIVE: To evaluate the effect of OSA on BP, glucose and lipid metabolism, and inflammatory activity in hypertensive patients. To compare clinical and laboratory analyzes characteristics, considering the presence of resistant hypertension (RH) and OSA. To assess genes possibly involved in the pathophysiological mechanisms of BP control according to the presence of RH and OSA.

METHODS: Patients were divided into 2 groups, with and without RH (non-RH). They were evaluated according to their clinical characteristics, sleep (polysomnography), ambulatory blood pressure monitoring (ABPM), genetics and laboratory analyzes.

RESULTS: A total of 205 hypertensive patients (55.4 ± 10.1 years) were enrolled, 105 were RH and 100 non-RH. OSA (apnea and hypopnea index > 15 events / hour) was present in 34% of RH, with no significant difference compared to non-RH (28%). Severe OSA group had a higher proportion of male gender (68%) compared to other groups according to the classification of OSA ($p < 0.05$). Patients with severe OSA presented less sleep dip in diastolic BP compared with those with moderate OSA (12.4 ± 8.5 vs. 18.5 ± 11.5%, $p < 0.05$). All models in which the clinical characteristics associated with OSA and RH were considered, it was found that OSA was related to lower diastolic BP only in females, and in patients with RH. Despite adjustment of variables, and regardless of OSA rank, patients with OSA showed a higher average of C4 compared to patients without OSA ($p = 0.019$). RH group, compared to non-RH, presented a predominance of female gender, non-white race, diabetes, dyslipidemia, and decreased systolic BP dipping during sleep. The highest rates of C4 were found even after adjustment for variables in RH group compared to non-RH (24.4 ± 8.1 vs. 21.7 ± 6.9 mg / dL, $p = 0.043$). The RH group had a higher REM sleep latency and reduced sleep efficiency compared to non-HR (146.6 ± 81.7 vs. 120.3 ± 70.8 min, $p = 0.016$, 73.5 ± 15.5 vs. 78.1 ± 11.2 %, $p = 0.016$ respectively). Regarding genetic analyzes no significant and important results were observed between polymorphisms or expression evaluation.

CONCLUSION: The prevalence of OSA among hypertensive patients is significant and this diagnosis was associated only in females and in patients

with RH to lower levels of diastolic BP when compared to those without OSA. Patients with severe OSA had lower sleep dip in diastolic BP and increased inflammation. RH patients had a higher prevalence of cardiovascular risk factors and poorer sleep quality when compared to non-RH group. More comprehensive studies assessing not only the DNA and mRNA expression, but also their features, are required to better define the role of genetics in RH and OSA.

Descriptors: Obstructive sleep apnea. Blood pressure. Hypertension. Inflammation

Introdução

1.1 Hipertensão arterial

Atualmente, a hipertensão arterial representa o mais importante fator de risco para a doença cardiovascular, sendo esta a principal causa de óbito no Brasil e no mundo[1,2]. Estudos populacionais apontam para prevalência de aproximadamente 20% a 30% de hipertensão arterial[3-6]. Entretanto, apesar dos esforços de Saúde Pública, atingir as metas de pressão arterial (PA) tem sido desapontador na maioria dos países. O Canadá mostra taxa de controle de 65%[5], enquanto nos Estados Unidos (EUA)[6] ela não passa de 50% e é de menos de um terço em outras partes do mundo[3,7].

A refratariedade ao tratamento anti-hipertensivo tem aumentado nas últimas décadas[8], fazendo-se com que a hipertensão arterial resistente (HAR) estabeleça-se como importante entidade clínica. O documento que, pela primeira vez, descreveu de forma completa a HAR foi publicado em 2008 pela American Heart Association, tendo despertado atenção especial a esta manifestação clínica e promovido desde então maior importância ao tema8. A partir disto, a Sociedade Brasileira de Cardiologia também se manifestou publicando, em 2012, o I Posicionamento Brasileiro sobre HAR[9].

Apesar de prevalência exata ainda muito discutida, estima-se que 20% a 30% dos pacientes em estudos clínicos tenham HAR[8]. Mais

recentemente, entretanto, trabalhos com o objetivo de analisar a prevalência de HAR mostraram percentuais menores, entre 12% e 16%[10,11].

De toda forma, como o envelhecimento e a obesidade são importantes fatores de risco, que notadamente também levam ao menor controle da PA, a incidência de HAR tende a aumentar conforme a população se torna mais idosa e obesa. Dados do *National Health and Nutrition Examination Surveys* sinalizam que houve aumento de prevalência de pacientes com HAR, de 15,9% em 1998-2004 para 28% em 2005-2008 ($p < 0,001$)[12] entre indivíduos aparentemente tratados para hipertensão arterial.

Na avaliação dos pacientes hipertensos, 5% a 10% apresentarão etiologia identificável da hipertensão, passível ou não de correção, caracterizando a causa secundária do aumento de pressão[1]. Excluindo-se a má adesão à terapêutica proposta e o efeito ou hipertensão do avental branco, deve-se instituir a avaliação de causas secundárias, tais como apneia obstrutiva do sono (AOS), hiperaldosteronismo, nefropatia, feocromocitoma e doença renovascular, principalmente nos pacientes com HAR. São considerados hipertensos resistentes os pacientes em uso, há no mínimo três meses, de três classes de fármacos em doses otimizadas, idealmente sendo um deles diurético, sem controle da PA, ou necessitando de quatro ou mais classes para atingir a meta terapêutica[8].

1.2 Apneia obstrutiva do sono

A alta prevalência e o amplo espectro de gravidade da AOS em adultos têm sido bem documentados por vários estudos de coorte de base populacional realizados nos EUA, Europa, Austrália, Ásia, e América Latina, incluindo-se o Brasil[13-16]. A maior parte desses estudos mostra que aproximadamente um em cada cinco adultos apresenta AOS pelo menos leve, e um em cada 15 tem AOS moderada ou grave. No entanto, mais de 85% dos pacientes com AOS clinicamente significativa e tratável nunca foram diagnosticados[17,18].

Revisão sistemática recente, após avaliação de 42 estudos publicados entre 1966 e 2013, observou prevalência média de AOS em 50% dos pacientes referidos a laboratórios de sono, considerada, nesta análise, AOS o encontro de índice de apneia e hipopneia (IAH) maior ou igual a 10 ou 15 eventos/hora[19].

Tufik et al. avaliaram 1.042 voluntários na cidade de São Paulo e encontraram prevalência de 33% da síndrome da AOS, considerando a soma dos indivíduos com IAH maior que 5 eventos/h com sintomas, e indivíduos com IAH maior que 15 eventos/h independente de sintomas[15]. Em outro estudo realizado no Brasil, Gonçalves et al. encontraram 38% de prevalência de AOS entre hipertensos não resistentes em Porto Alegre[20].

Na população hipertensa resistente, em estudo realizado por Gonzaga et al. em Birmingham, EUA, após avaliação prospectiva de 109 pacientes com HAR, foi encontrada prevalência de AOS (IAH maior que

5 eventos/h) de 77%[21]. Dados semelhantes registram-se na análise prospectiva de 41 pacientes, quando Logan et al. encontraram prevalência de 83% de AOS, considerada pelo autor neste estudo como IAH maior ou igual a 10 eventos/h[22]. Corroboram com estes achados os dados de estudo espanhol que mostram prevalência de 70% de AOS grave (IAH maior ou igual a 30 eventos/hora) em pacientes com HAR[16].

Em estudo prospectivo realizado pelo Laboratório do Sono do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) e pelo Laboratório do Sono do Instituto do Coração – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram analisados consecutivamente 125 pacientes com HAR submetidos à avaliação sistemática para coarctação da aorta, síndrome de Cushing, AOS, feocromocitoma, hiperaldosteronismo, doença renovascular e renal parenquimatosa, medicamentos e doenças da tireóide[23]. Cabe ressaltar que esta avaliação foi realizada independente da presença de quaisquer sinais e sintomas, concluindo-se que a AOS (definida por IAH maior que 15 eventos/h) foi a condição clínica mais associada com HAR em 64% dos pacientes analisados, seguida pela hipertensão primária, sem qualquer condição clínica diagnosticada, conforme mostrado na Gráfico 1.

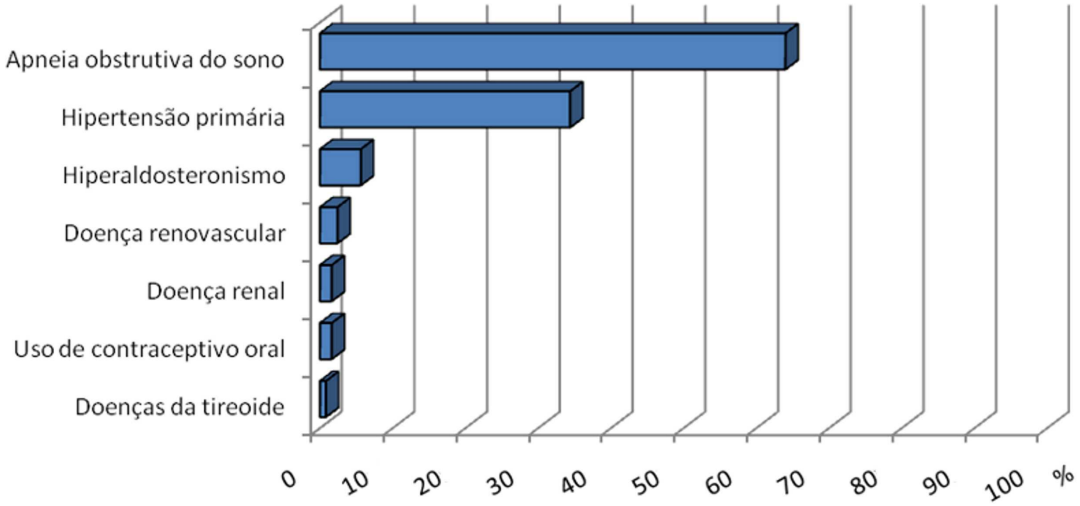

GRÁFICO 1. Prevalência de causas secundárias de hipertensão associadas à resistência ao tratamento anti-hipertensivo (FONTE: adaptado de Pedrosa et al.[23] Hypertension, 2011).

A triagem para AOS pode ser realizada por meio do Questionário de Berlim e a sonolência diurna avaliada pela Escala de Sonolência de Epworth, sendo que o exame diagnóstico padrão é a polissonografia[24].

1.2.1 Mecanismos fisiopatológicos da apneia obstrutiva do sono

A AOS é caracterizada por episódios recorrentes de interrupção parcial (hipopneias) ou total (apneias) da respiração durante o sono, decorrentes de colapso das vias aéreas na região da faringe[24]. O colapso na faringe ocorre geralmente na parte posterior da língua, úvula e palato mole, ou em alguma combinação dessas estruturas (Figura 1)[24].

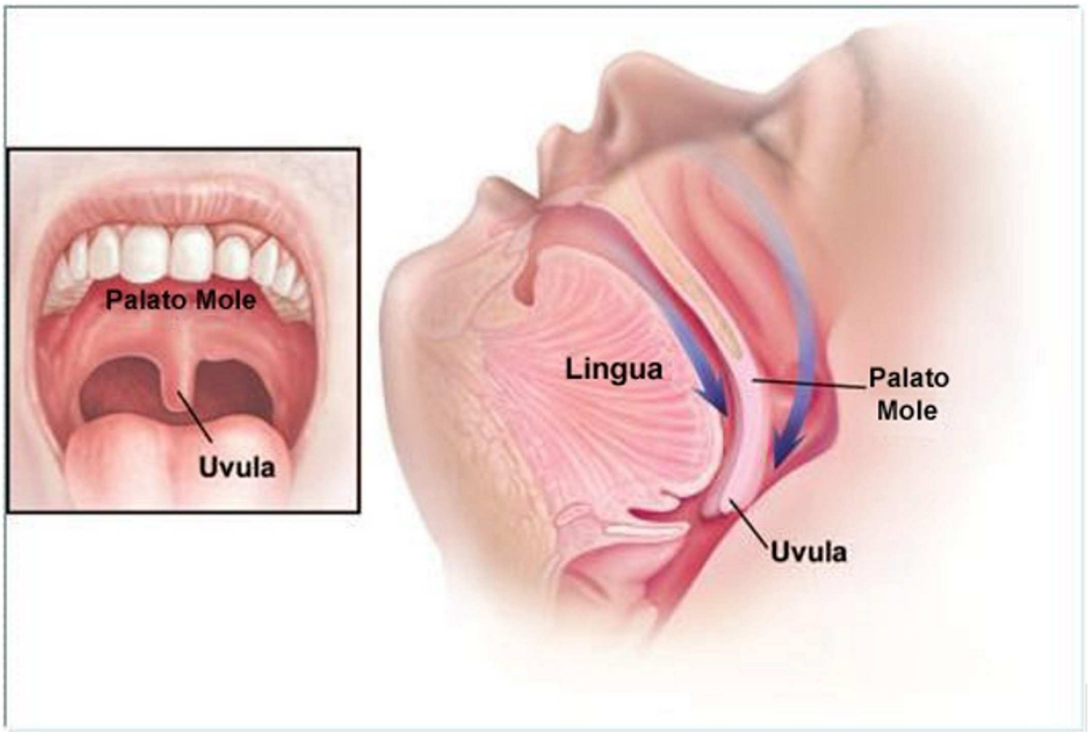

FIGURA 1. Anatomia orofaríngea. Durante o sono ocorre relaxamento da musculatura, com bloqueio parcial ou total da passagem de ar na faringe, incluindo tipicamente a região posterior da úvula e/ou parte posterior da língua, correspondendo a naso e orofaringe, respectivamente[24] (FONTE: adaptado de Somers VK et al. Circulation 2008).

A faringe tem relativamente poucas estruturas ósseas ou suportes rígidos e, portanto, é altamente dependente da atividade muscular para manter sua patência[24]. A anormalidade primária em pacientes com AOS é a presença de um estreitamento anatômico da faringe que gera maior resistência ao fluxo de ar em vias aéreas superiores, resultante da interação entre estruturas ósseas, tecidos moles, obesidade ou, particularmente em crianças, aumento das amígdalas e adenoides.

Durante a vigília, as vias aéreas estreitas não causam sintomas. Mecanorreceptores respondem reflexivamente ao incremento da pressão

negativa gerado pela maior resistência e aumentam a atividade de uma série de músculos dilatadores da faringe, mantendo a permeabilidade das vias aéreas durante a vigília. No entanto, durante o sono, a atividade muscular reflexa da faringe que coordena esta compensação neuromuscular é reduzida ou perdida, levando à diminuição da atividade dos músculos dilatadores da faringe e, finalmente, ao estreitamento ou colapso total das vias aéreas superiores.

Durante os eventos respiratórios (apneia ou hipopneia), ocorre hipóxia e hipercapnia além de esforço ventilatório progressivamente maior. Estes fenômenos terminam tipicamente com um despertar que, geralmente não é percebido conscientemente pelo paciente acometido, e que estimula o sistema nervoso autônomo simpático[25] (Figura 2). Repetidos durante a noite, os eventos respiratórios são acompanhados por aumento mediado pelos quimiorreflexos da atividade simpática nos vasos sanguíneos periféricos com consequente vasoconstrição[26]. Além das alterações na regulação autonômica, a AOS pode causar doença cardiovascular por diversos mecanismos, incluindo inflamação sistêmica, estresse oxidativo, alterações metabólicas, resistência à insulina, dislipidemia, disfunção endotelial e progressão da aterosclerose[26].

Uma das características descritas da AOS é o perfil de PA com descenso do sono atenuado ou ausente, resultante da atividade simpática aumentada durante esse período, decorrente de quatro estímulos principais: hipoxemia intermitente, hipercapnia, ausência de insuflação adequada do pulmão e despertares no final dos episódios de apneia[24,25]. O efeito

cumulativo da ativação simpática excessiva, junto a outros fatores vasoativos liberados em resposta à hipóxia, pode resultar em hipertensão diurna sustentada nestes pacientes.

Concomitante aos mecanismos já citados, a AOS pode se associar à hipertensão pelo aumento de aldosterona principalmente nos indivíduos resistentes, fato que acarretaria maior retenção salina e volumétrica, piorando tanto a hipertensão, como a própria apneia pelo maior edema na região de hipofaringe[21,27]. Entretanto, para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nessa associação, mais estudos ainda são necessários.

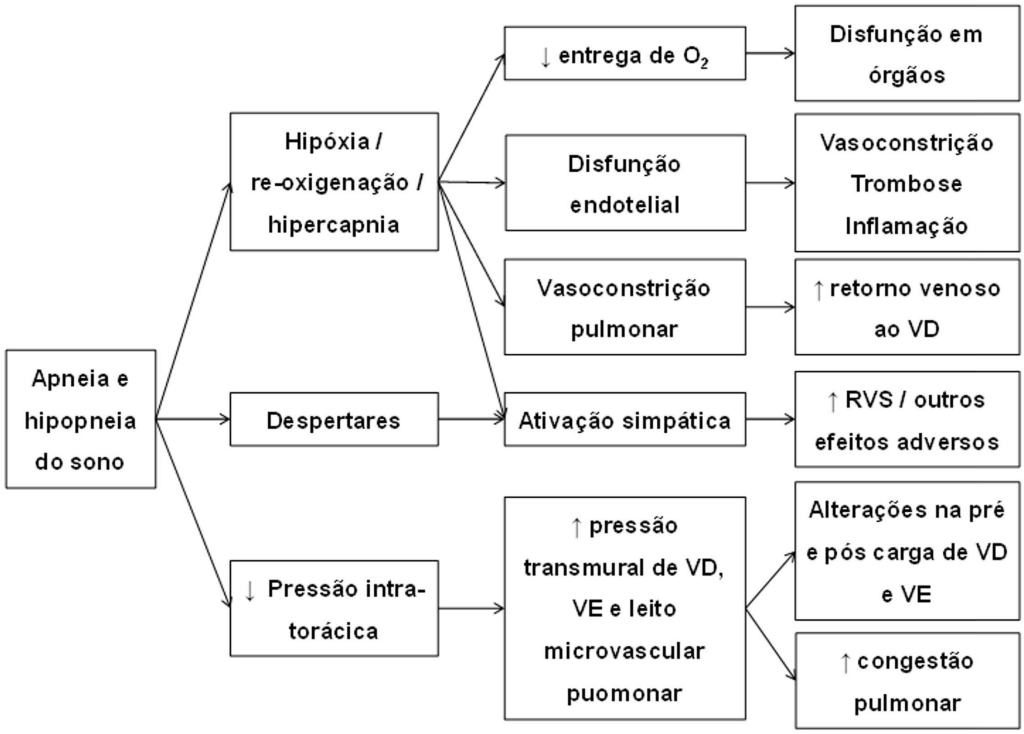

FIGURA 2. Potenciais mecanismos pelos quais a apneia obstrutiva do sono influencia a hipertensão[28] (FONTE: adaptado de Somers VK, et al. Principles and practice of sleep medicine, 2011.[28]). ↓= diminuição; ↑= aumento; O^2= oxigênio; RVS= resistência vascular sistêmica; VD= ventrículo direito; VE= ventrículo esquerdo.

1.2.2 Apneia obstrutiva do sono e comorbidades cardiovasculares

A AOS e a obesidade frequentemente coexistem e interagem, compartilhando múltiplos mecanismos fisiopatológicos e seus consequentes fatores de risco cardiovascular[29] como a diabetes mellitus tipo II (DM), a dislipidemia e a inflamação sistêmica[24,29-31]. Embora evidências experimentais e dados emergentes em humanos indiquem associação entre AOS e dislipidemia, ainda permanece controversa essa relação, necessitando-se que mais estudos delineados para esta avaliação sejam realizados[32]. Interessante notar que algumas alterações, como a resistência insulínica e a intolerância à glicose podem estar presentes na AOS, independentemente da obesidade[33,34].

Marcadores de inflamação sistêmica e de disfunção endotelial, como a proteína C reativa ultrassensível (PCR-us)[35,36] e o ácido úrico[37-39], também têm sido associados à AOS[40-42] e à hipertensão[35,36,43,44]. Além destes marcadores, sugere-se a ligação das frações do complemento, C3 e C4 com a hipertensão[45-47], entretanto, em relação à AOS, os trabalhos são escassos[48].

Além da AOS se associar à obesidade, inflamação, dislipidemia e DM, e ainda, ao aumento da PA[49-52], há também evidências sugerindo maior risco para o surgimento de arritmias, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e óbito, conforme mostra a Tabela 1[24,53].

Tabela 1. Doenças cardiovasculares associadas à apneia obstrutiva do sono[5, 16].

Doenças
Acidente vascular cerebral
Arritmias ventriculares
Aterosclerose
Fibrilação atrial
Hipertensão arterial
Hipertrofia ventricular esquerda
Infarto agudo do miocárdio
Insuficiência ventricular sistólica e diastólica
Resistência insulínica
Sobrecarga atrial
Doença coronária
Mortalidade por doença cardiovascular

Apesar de todas as comorbidades associadas à AOS, é indiscutível que a maior preocupação se deve à demonstração do aumento do risco de óbito, principalmente pelo aumento da ocorrência do infarto agudo do miocárdio[54]. Assim, torna-se fundamental o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na AOS, bem como a evolução no

diagnóstico e no tratamento da AOS no intuito de diminuir a morbimortalidade cardiovascular.

1.3 Polimorfismos genéticos

Um dos fatores que pode influenciar a falta de controle adequado da PA é a dificuldade de predizer a eficácia de medicamentos anti-hipertensivos individualmente, ou seja, para cada paciente. A farmacogenética tem como objetivo identificar ferramentas de triagem para melhorar a prática clínica. Se o clínico souber, fundamentado no genótipo de cada paciente, quais medicamentos serão mais efetivos em reduzir a PA com menos efeitos adversos, o período de tentativa e erro na monitorização terapêutica será possivelmente menor e, consequentemente, a resposta ao tratamento, melhor.

O progresso da farmacogenética no tratamento da hipertensão é limitado em parte devido à natureza multifatorial e multigênica da doença. A hipertensão é doença complexa, poligênica, que sofre influências ambientais (dieta, obesidade, stress, entre outros) e que, apesar das observações em vários estudos sugerirem que cerca de 50% das alterações de PA possam ser explicadas por fatores genéticos, a maior parte dos genes que se associariam à grande proporção dessa variação ainda não foi identificada[55].

Como a HAR representa um fenótipo extremo, parece razoável prever que os fatores genéticos possam desempenhar papel maior que na

população geral de hipertensos. No entanto, as avaliações genéticas de pacientes com HAR são limitadas[56-58].

O sistema renina-angiotensina-aldosterona desempenha papel central na regulação da PA[59], sendo que a angiotensina II é potente vasoconstritor que estimula a reabsorção do sódio no rim. No entanto, a produção crônica de angiotensina II pode resultar em remodelação e reestruturação de vários órgãos cardiovasculares. Outrossim, sabe-se que algumas variantes genéticas no sistema renina-angiotensina-aldosterona têm sido associadas com as diferenças funcionais nos genes correspondentes, contribuindo para elevação de 50% da variação fenotípica[60,61]. Entre os genes pertencentes a esta via destacam-se os da enzima conversora de angiotensina (ACE), do angiotensinogênio (*AGT*), do receptor tipo 1 da angiotensina II (*AGTR1*), e da aldosterona sintase (*CYP11B2*)[55].

A proteína alfa-aducina está envolvida na regulação da reabsorção renal de sódio, particularmente com seu gene *ADD1* (Gly460Trp). A literatura mostra, em alguns trabalhos, associação entre seus polimorfismos e hipertensão[62]; entretanto tal achado não foi observado na população indiana[63].

Os polimorfismos do gene CYP17A1 estão possivelmente ligados à formas moderadas de deficiência ou disfunção da enzima 17-alfa-hidroxilase[64], sendo que há evidências fracas de associação com a hipertensão em pacientes diabéticos coreanos[64], porém achados mais evidentes em outros trabalhos asiáticos[65], e grandes coortes multicêntricas[66,67].

Embora em algumas coortes tenham sido observadas associações entre a PA e os polimorfismos do gene precursor do peptídeo natriurético tipo A (*NPPA*), têm-se encontrado diferentes desfechos cardiovasculares baseados na predominância de alguns de seus alelos[68-72].

Apesar de resultados conflitantes em relação aos polimorfismos dos genes *CYP1A2, FGF5, MTHFR, c10orf107, ZNF652* e *PLCD3*, grande análise de Newton-Cheh et al. identificou correlação entre suas variações alélicas e a PA[57,65,67].

1.4 Expressão gênica

O principal regulador em sensibilizar as condições de hipóxia e em integrar uma resposta adaptativa via expressão gênica é o fator de transcrição *hypoxia-inducible factor-1* (*HIF-1*)[73]. O *HIF-1* ativa a transcrição de genes que codificam proteínas responsáveis por aumentar o fornecimento de oxigênio, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF - vascular endothelial growth factor A*), a eritropoetina, e a endotelina-1 ou promovem adaptações metabólicas em condições de reduzida disponibilidade de oxigênio. Tais fatores mediam resposta adaptativa à hipóxia tecidual dirigida no sentido de aumentar a perfusão e a oxigenação e, consequentemente, superando a hipóxia inicial[73].

Até o momento não há estudos que mostrem associação entre expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA)[74] do gene do ACE com a hipertensão ou a AOS.

Hipótese

Em pacientes hipertensos, as alterações na pressão arterial, no perfil metabólico e na atividade inflamatória estariam associadas à AOS.

Objetivos

3.1 Primário

Avaliar o efeito da AOS sobre a pressão arterial, metabolismos glicídico e lipídico, e atividade inflamatória nos pacientes hipertensos.

3.2 Secundários

- Comparar os pacientes em relação às características clínicas e laboratoriais, considerando a presença de HAR e AOS.
- Analisar se os polimorfismos genéticos a seguir estão relacionados à HAR e AOS. Polimorfismos avaliados: *ACE* ID (inserção (I), deleção (D)[55,71,74-78]; *AGT*: Met235Thr (rs699)[55]; *AGTR1*: A1166C (rs5186)[71,75,79]; *CYP11B2*: C-344T (rs1799998)[55,56,80-82]; ADD1: Gly460Trp[62,63,83]; *CYP17A1*: rs11191548[64-67]; *CYP1A2* rs1378942[57,65,67]; NPPA: T2238C[68,69,72]; *FGF5*: rs16998073[57,65,67], *MTHFR* rs17367504[57,65,67]; c10orf107: rs1530440[57,67]; *ZNF652*: rs16948048[67]; *PLCD3*: rs12946454[67].
- Avaliar a expressão de mRNA dos genes *ACE, HIF-1, VEGF* de acordo com a presença de AOS e HAR.

Casuística

4.1 População

Entre abril de 2011 e janeiro de 2013 foram incluídos 212 pacientes de 30 a 75 anos, não aparentados, de ambos os sexos, de qualquer etnia e de forma consecutiva até que fosse atingido o número adequado (conforme cálculo amostral prévio) e semelhante para os grupos com HAR (grupo HAR) e sem HAR (grupo não-HAR). O recrutamento ocorreu entre os indivíduos atendidos nas Seções Médicas de Hipertensão Arterial e Nefrologia e de Dislipidemias do IDPC.

O grupo HAR foi composto por pacientes hipertensos resistentes, ou seja, não controlados (PA no consultório maior que 140 x 90 mm Hg) em uso de três classes de fármacos anti-hipertensivos há pelo menos três meses, em doses otimizadas, idealmente incluindo um diurético, ou necessitando de quatro ou mais classes para atingir a meta terapêutica[8].

O grupo não-HAR incluiu indivíduos hipertensos com PA controlada em uso de até três classes de fármacos (PA menor que 140 x 90 mm Hg) ou, ainda, hipertensos não controlados com PA estágio 1 ou 2, segundo a VI Diretriz Brasileira de Hipertensão (PA entre 140-159 x 90-99 mm Hg e entre 160-179 x 100-109 mm Hg, respectivamente) em uso de, até, duas classes de fármacos[1].

Dos 212 pacientes inicialmente incluídos, sete foram excluídos por não serem hipertensos, resultando em 205 indivíduos a serem avaliados.

4.2 Delineamento do estudo

Após assinar termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A), os indivíduos participantes realizaram as visitas conforme mostra a Figura 3. Na Visita 0, que incluiu anamnese, exame físico, e medida da PA de acordo com a VI Diretriz Brasileira de Hipertensão[1], foram avaliados os critérios de inclusão e exclusão dos participantes.

Na Visita 1, realizou-se a polissonografia. No dia seguinte, pela manhã (Visita 2), foram colhidas amostras de sangue, realizadas análise da PA periférica e central de forma não invasiva (pela tonometria) e instalação da monitorização ambulatorial da PA (MAPA) que foi retirada 24 horas depois. Na Visita 3, realizada até um mês após a polissonografia, foram apresentados os resultados dos exames aos pacientes, quando os mesmos receberam orientações médicas quanto aos respectivos diagnósticos e tratamento.

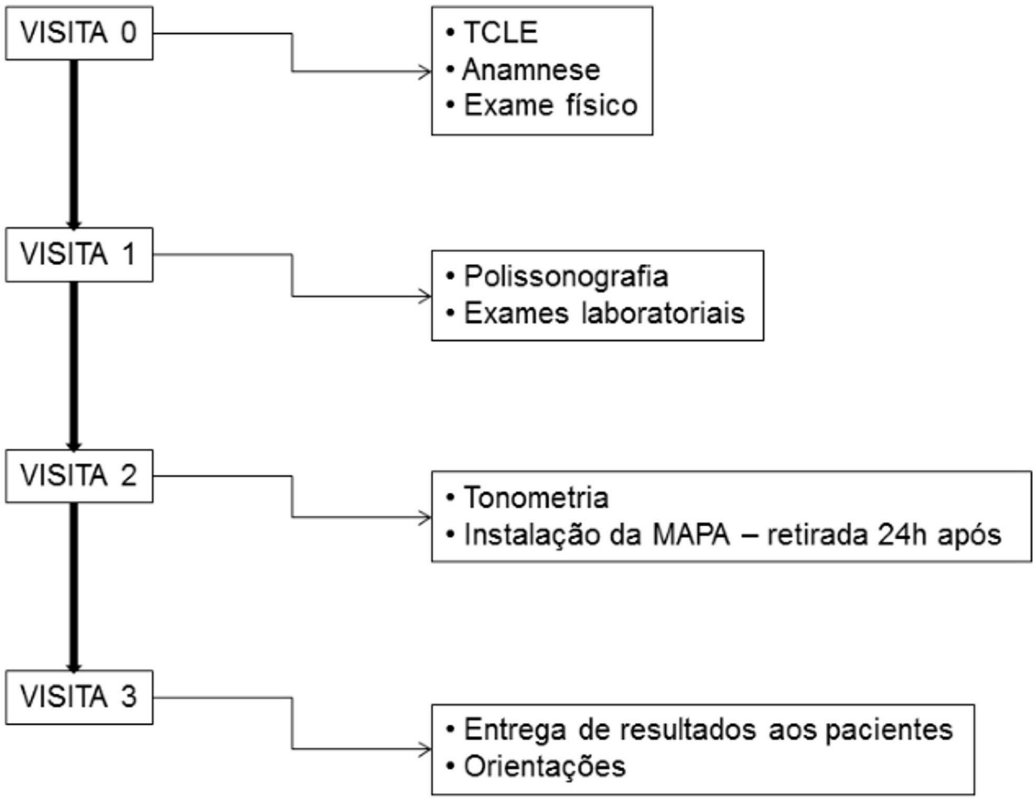

FIGURA 3. Fluxograma do estudo.

4.3 Critérios de inclusão

- Assinar o TCLE;
- Idade maior que 30 anos e menor que 75 anos;
- Diagnóstico de hipertensão arterial há pelo menos três meses.

4.4 Critérios de exclusão

- Insuficiência renal (taxa de filtração glomerular menor que 60 mL/min calculada pela fórmula de Cockcroft-Gault);

- Insuficiência cardíaca (sintomática e/ou fração de ejeção de ventrículo esquerdo menor que 50% em exame prévio);
- Má adesão à terapêutica (observada durante consulta médica ou internação por meio de controle pressórico com uso de até três classes de fármacos anti-hipertensivos);
- Mudança no tratamento nas últimas quatro semanas;
- Uso crônico de corticóides, moderadores de apetites, anti-inflamatórios não esteroidais e/ou descongestionantes nasais (por período maior que três semanas);
- Estenose de artéria renal;
- Feocromocitoma;
- Doença renal parenquimatosa;
- Hiperaldosteronismo manifesto;
- Coarctação de aorta;
- Hipotireoidismo não controlado;
- Vigência ou suspeita de processo inflamatório sistêmico;
- Gravidez e/ou amamentação;
- Uso abusivo de álcool ou de substâncias ilícitas;
- Hepatopatia grave;
- Uso de marcapasso ou cardiodesfibrilador implantável;
- Doenças psiquiátricas que poderiam impedir o cumprimento do protocolo;
- Antecedente de acidente vascular cerebral ou infarto agudo do miocárdio até seis meses antes da inclusão no estudo;

- Doenças graves e/ou câncer com prognóstico de sobrevida menor que um ano.

4.5 Critérios de interrupção do estudo

Indivíduos que manifestassem o desejo de não mais participar do estudo ou que passassem a apresentar um ou mais critérios de exclusão.

Métodos

5.1 Avaliação clínica

Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados:

1. Idade, raça (considerada a relatada pelo próprio sujeito de pesquisa), gênero.
2. Tabagismo; sendo considerado tabagista atual o indivíduo que fumava um ou mais cigarros rotineiramente ou, ainda, que fumou de forma rotineira até há um ano; e ex-tabagista o indivíduo que abandonou o vício há mais de um ano[84].
3. Etilismo: considerado etilismo atual a ingesta de bebida alcoólica de forma regular com interferência nas atividades rotineiras, ou ingesta pelo menos três vezes por semana do correspondente a mais de 30 g de etanol para homens e 15 g para mulheres; ex-etilismo considerado o abandono do vício há pelo menos um ano.
4. Atividade física: foi considerada como regular qualquer atividade física realizada por, no mínimo 30 minutos, três vezes na semana.
5. Peso e altura: foram aferidos em balança antropométrica.

6. Índice de massa corpórea (IMC): foi calculado pela fórmula peso dividido pelo quadrado da altura. Considerou-se eutrofismo IMC < 25 Kg/m^2; sobrepeso IMC ≥ 25 e < 30 Kg/m^2; obesidade IMC ≥ 30 Kg/m^2 [85].
7. Circunferência abdominal: foi aferida com fita métrica inelástica na altura do ponto médio da distância entre a crista ilíaca ântero-superior e o rebordo inferior do último arco costal, com o paciente em pé e ao final da expiração[86].
8. Circunferência do quadril: foi aferida com fita métrica inelástica na altura do maior diâmetro da região glútea, com o paciente em pé[86].
9. Circunferência cervical: foi aferida com fita métrica inelástica na altura do ponto médio do pescoço, com o paciente em pé. Em indivíduos do sexo masculino, foi iniciou-se a medição imediatamente abaixo da proeminência laríngea.
10. PA: aferida com esfigmomanômetro automático digital Omron modelo HEM-705CP (*Omron Heath Care*, Inc. Vermon Hills, Illinois, EUA) em posição sentada, após cinco minutos de repouso, de acordo com a VI Diretriz Brasileira de Hipertensão[1].
11. Hipertensão arterial: uso rotineiro de anti-hipertensivos ou a medida da PA de consultório maior ou igual a 140 x 90 mm Hg[1].
12. Dislipidemia: uso rotineiro de qualquer hipolipemiante ou dosagem de LDL-colesterol acima de 160 mg/dL e/ou

triglicérides acima de 150 mg/dL e/ou HDL-colesterol abaixo de 40 mg/dL para homens ou de 50 mg/dL para mulheres[86].

13. DM: uso rotineiro de hipoglicemiante oral e/ou insulina, ou glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dL em duas medidas, após jejum de pelo menos 8 horas; ou glicemia de jejum maior ou igual a 200 mg/dL no teste de tolerância oral à glicose (75 g), após 120 minutos ou, ainda, na presença de sintomas clássicos de hiperglicemia associada à glicemia aleatória maior ou igual a 200 mg/dL[87].
14. Hipotireoidismo: uso de levotiroxina. Não foram incluídos pacientes com hormônio tireoestimulante (TSH) fora dos limites da normalidade.
15. Angina, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC), ataque isquêmico transitório (AIT), insuficiência arterial periférica crônica (IAPC): de acordo com registro no prontuário ou resumo de alta.
16. História familiar de doença arterial coronária (DAC) prematura: parente de primeiro grau com antecedente de DAC abaixo de 55 anos para o sexo masculino e de 65 anos para o sexo feminino.
17. Questionário de Berlim de alto risco para AOS: duas categorias positivas, conforme descrito adiante na avaliação do sono (Anexo B).
18. Escala de Sonolência de Epworth: considerado com sonolência excessiva o paciente com pontuação acima de nove (Anexo C).

5.2 Amostras biológicas

As amostras para as determinações bioquímicas foram obtidas pela manhã, imediatamente após a realização da polissonografia, sendo utilizado sistema de coleta a vácuo, por meio do cateter *BD Saf-T-Intima (Becton Diokinson Infusion Therapy S.A. de C.V.*, EUA). Os soros e plasmas obtidos das amostras foram separados e, quando necessário, mantidos a -20 ˚C para as seguintes análises: glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA1C), insulina de jejum, leptina, colesterol total e frações, triglicérides, apolipoproteína A1 (Apo A1), apolipoproteína B (Apo B), PCR-us, complemento (C3 e C4), fibrinogênio, ferro, ferritina, transferrina, ácido úrico, hemograma, TSH, aldosterona, atividade da renina plasmática, creatinofosfoquinase, sódio, potássio, creatinina, peptídeo natriurético tipo B (BNP) e as análises de expressão gênica e genotipagens.

5.3 Determinação dos parâmetros laboratoriais

A metodologia das análises laboratoriais utilizadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Metodologia das análises laboratoriais.

Nome do Exame	Método	Material
Ácido úrico	Enzimático – Uricase	Soro
Aldosterona	Radioimunoensaio	Soro
Apolipoproteína A1	Nefelometria	Soro
Apolipoproteína B	Nefelometria	Soro
Atividade da renina plasmática	Radioimunoensaio cinético	Plasma
C3 – Fração do complemento	Nefelometria	Soro
C4 – Fração do complemento	Nefelometria	Soro
Colesterol total	Colorimétrico – Peroxidase	Soro
Creatinina	Colorimétrico – Jaffé	Soro
Creatinofosfoquinase	IFCC – Modificado de Szasz	Soro
Ferritina	Quimioluminescência	Soro
Ferro	Colorimétrico – Ferene	Soro
Fibrinogênio	Klauss modificado	Plasma
Glicose	Colorimétrico – Enzimático	Soro ou plasma
HDL – colesterol	Colorimétrico - Enzimático	Soro
HbA1C	HPLC	Sangue Total
Hemograma	Citoquímico / Isovolumétrico	Sangue Total
Insulina de jejum	Quimioluminescência	Soro
LDL – colesterol	Equação de Friedwald	Soro
Leptina	Radioimunoensaio	Soro
PCR-us	Nefelometria e/ou aglutinação	Soro
Peptídeo natriurético tipo B	Quimioluminescência	Plasma
Potássio	Eletrodo íon-seletivo	Soro
Sódio	Eletrodo íon-seletivo	Soro
Transferrina	Imunoturbidimetria	Soro
Triglicérides	Colorimétrico – Peroxidase	Soro
TSH	Quimioluminescência	Soro

IFCC= *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*; HbA1C= hemoglobina glicada; HPLC= cromatografia líquida de alta eficiência; PCR-us= proteína C reativa; TSH= hormônio tireoestimulante (FONTE: Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa / IDPC)

Todas estas determinações foram realizadas seguindo orientações do fabricante (Siemens, Munique, Alemanha), em analisador automático – Dimension RXL ou Centauro (Siemens, Munique, Alemanha) ou DADE Behring CA 1500 (Siemens, Munique, Alemanha).

O *Homeostasis Model Assesment Beta* (HOMA B), que avalia a função das células beta pancreáticas, foi calculado pela seguinte fórmula[88]:

$$\text{HOMA B} = \frac{(20 \times \text{Insulina de jejum})}{(\text{glicemia de jejum} / 18) - 3{,}5}$$

Os valores de referência são: ≤ 60% - secreção insuficiente de insulina pelas células beta; ≥ 250% - hipersecreção de insulina pelas células beta; entre 60% e 250% - normais.

O *Homeostasis Model Assesment IR* (HOMA IR), que avalia a resistência insulínica e cujo valor de referência é menor do que 2,71% para a normalidade foi calculado com a seguinte fórmula88:

HOMA IR = (glicemia de jejum x insulina de jejum) / 405

5.4 Avaliação do Sono

5.4.1 Estratificação de risco para apneia

Na estratificação do risco de distúrbios do sono, os pacientes foram avaliados em relação às suas características antropométricas (peso, altura, IMC, circunferências de cintura, quadril e cervical), e medicações indutoras do sono.

Foram aplicados o questionário de Berlim (Anexo B) e a Escala de Sonolência de Epworth (Anexo C). O questionário de Berlim indica alto risco para AOS quando possui pelo menos duas categorias “positivas”. Para uma categoria ser considerada positiva, pelo menos duas respostas das envolvidas pelo retângulo devem ter sido assinaladas. A Escala de Sonolência de Epworth indica sonolência excessiva quando acima de nove. Ambos os métodos são de triagem, tendo o questionário de Berlim sensibilidade e especificidade razoável para ser incorporado na prática clínica diária de avaliação de distúrbios do sono[24].

5.4.2 Polissonografia

A polissonografia, exame que faz o registro completo da atividade elétrica cerebral, da respiração e de sinais indicativos de relaxamento muscular, movimentos oculares, oxigenação sanguínea, frequência cardíaca, durante uma noite em que o indivíduo dorme no hospital (Figuras 4 e 5), foi realizada no Polissonígrafo Digital Alice 5 (Respironics - Royal Philips, Holanda), sob a supervisão de profissional técnico especializado. A leitura do exame e sua interpretação obedeceram às recomendações da American *Academy of Sleep Medicine* publicadas em 2007[89], sendo realizada por dois médicos do Laboratório do Sono do IDPC, ambos tendo recebido treinamento especializado em Medicina do Sono. A leitura dos exames foi realizada de forma “cega” em relação à identificação dos pacientes e suas características clínicas. Na presença de discordância maior

que 20% entre os laudos (estágios do sono e IAH) dos dois médicos, realizou-se revisão em conjunto.

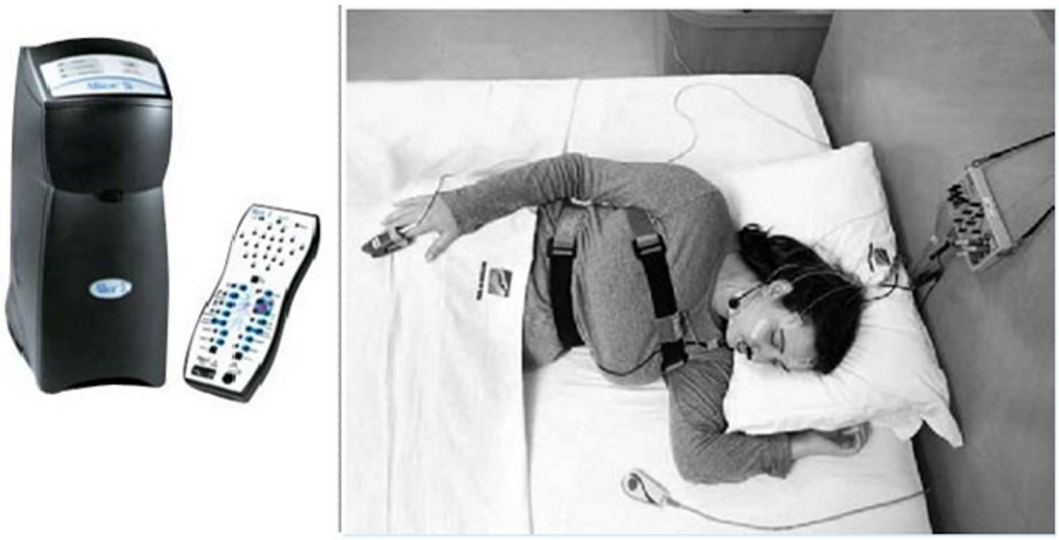

FIGURA 4. Polissonígrafo Alice 5 (Respironics - Royal Philips, Holanda) e paciente após o preparo para exame de polissonografia[90] (FONTE: adaptado de Bittencourt LRA, et al. Rev Bras Hipertens 2009).

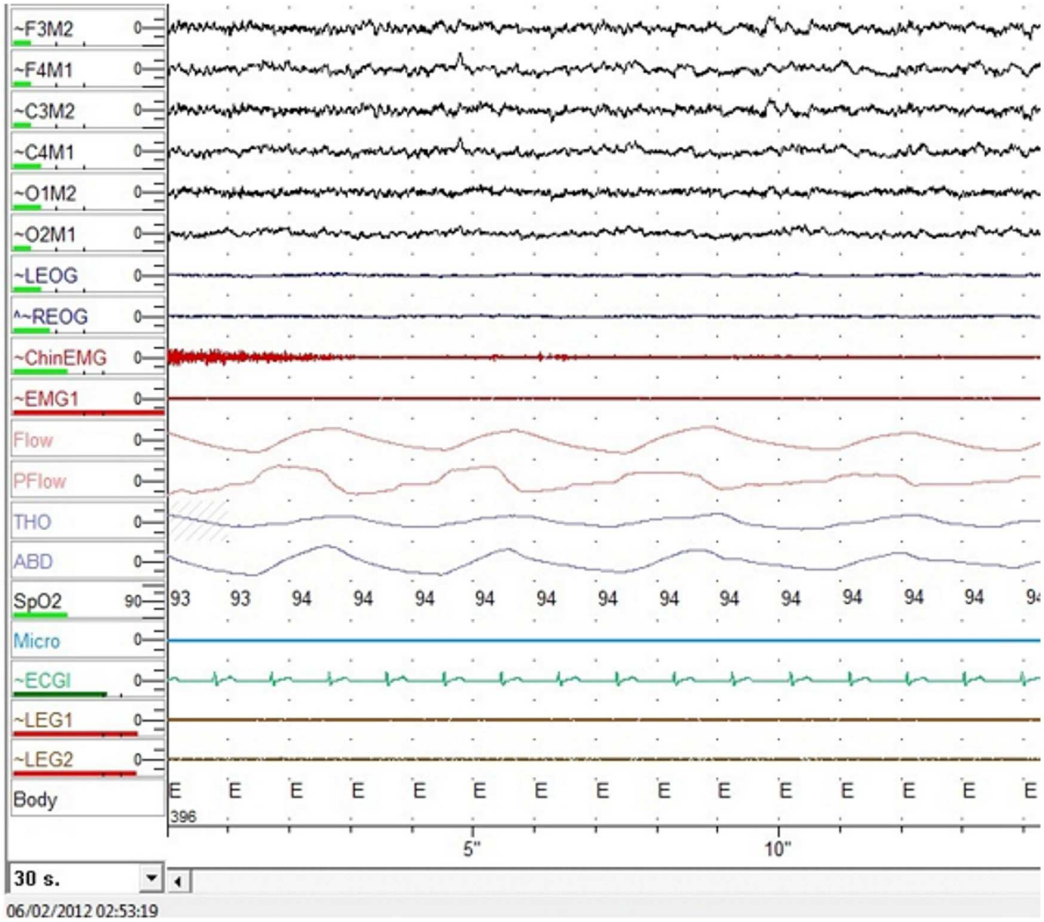

FIGURA 5. Trecho de tela de aquisição do exame de polissonografia. (FONTE: Laboratório do Sono - IDPC).
De cima para baixo: F3M2 a O2M1 = eletroencefalograma, LEOG e REOG= eletro-oculograma esquerdo e direito; *Chin* EMG e EMG1= eletromiograma da região do mento; *Flow* e *PFlow*= curva do fluxo respiratório pelo termistor e pela cânula de pressão nasal respectivamente; THO e ABD= curva de expansibilidade do tórax e abdome respectivamente; SpO_2= saturação da oxi-hemoglobina; micro= microfone; ECG 1= eletrocardiograma; LEG1 e LEG2= movimento de membros inferiores; *Body*= posição do corpo (no exemplo, E= esquerdo).

As instruções entregues ao paciente para o preparo ao exame de polissonografia incluíram as seguintes recomendações:

1. Lavar a cabeça com xampu neutro, não usar creme, condicionador ou gel;

2. Não usar cremes, loções ou hidratantes corporais;
3. Trazer roupa bem confortável para dormir, sem elástico nos punhos e tornozelos;
4. Trazer travesseiro (caso não se sinta confortável usando outro) e objetos de uso pessoal;
5. Barbear-se;
6. Não usar esmalte de cor escura, manter unhas curtas;
7. No dia do exame evitar cafeína;
8. Não ingerir bebida alcoólica nas 48 horas antes do exame;
9. Manter uso de medicamentos (a suspensão somente deverá ser feita por recomendação médica prévia);
10. Trazer a(s) receita(s) médica(s) dos medicamentos dos quais faz uso;
11. Trazer todos os medicamentos em uso.

5.5 Monitorização ambulatorial da pressão arterial

A MAPA avaliou a PA nas 24 horas por meio do registro da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) a cada 20 minutos na vigília e 30 minutos no período do sono, pelo método oscilométrico. O aparelho utilizado na Seção de Hipertensão Arterial e Nefrologia do IDPC foi o Spacelabs modelo 90207, (*Spacelabs Healthcare, Issaqhah*, Washington, EUA).

5.6 Análise da pressão central

A análise da onda de pulso na aorta central foi realizada de forma não-invasiva pela tonometria de aplanação (registro da pressão sobre a parede arterial por um transdutor) das artérias carótida e radial91 proporcionando a obtenção dos valores do índice de incremento (augmentation index) da PA central e da velocidade de onda de pulso (VOP). O dispositivo empregado foi o sistema SphygmoCor (AtCor Medical, West Ryde, Austrália) (Figura 6).

Para permitir o cálculo da VOP, utilizou-se registro eletrocardiográfico simultâneo. A distância entre as superfícies foi medida partindo-se do pulso da artéria carótida, geralmente na altura da proeminência da cartilagem cricóide lateralmente, até o pulso radial no local de maior amplitude, onde se posicionou o transdutor para a análise[92-96]. Quanto à estimativa da velocidade, posicionou-se o transdutor sobre a artéria a ser analisada por, pelo menos, 11 segundos. A VOP foi automaticamente calculada como a razão entre a distância da artéria carótida e a radial do mesmo lado e o tempo necessário para que o sinal do ultrassom *Doppler* transitasse entre elas[91].

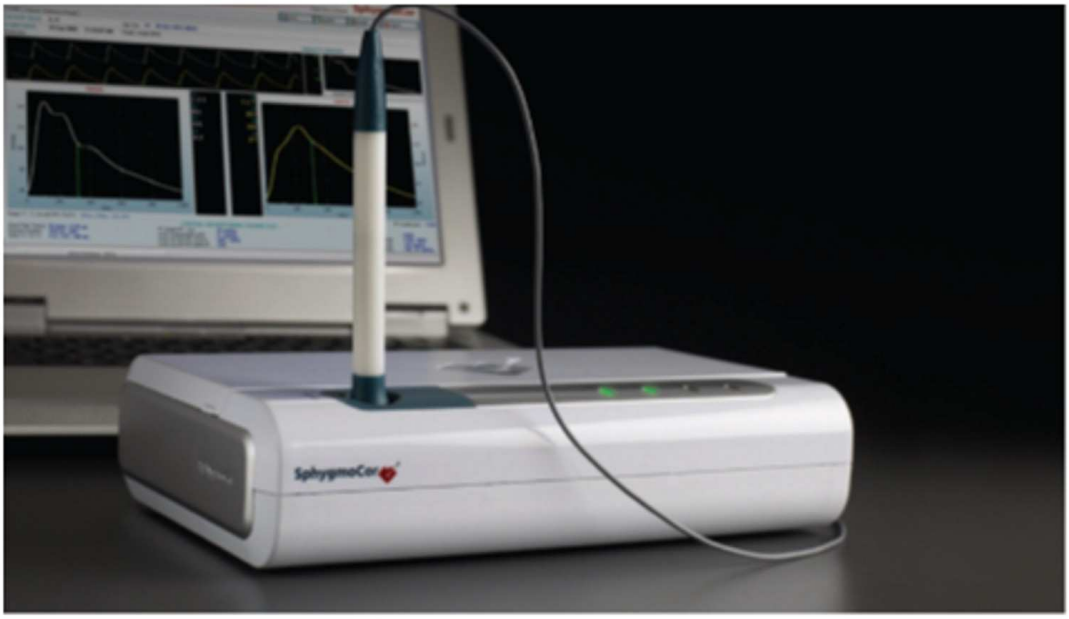

FIGURA 6. SphygmoCor (AtCor Medical, West Ryde, Austrália). (FONTE: www.atcormedical.com).

Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo médico em sala com temperatura e iluminação agradáveis, sem ruídos externos. Pacientes com diagnóstico de fibrilação atrial, flutter atrial, bradicardia ou taquicardia não realizaram análise de onda de pulso e VOP. Pacientes com doença carotídea demonstrada pelo ultrassom *Doppler*, ou por sopro ao exame físico, também não realizaram a VOP. Tendo em vista o melhor controle de qualidade, foram aceitos como válidos apenas exames com índice de operador maior ou igual a 80%.

No preparo para a realização do exame, orientou-se antes do procedimento:

- não ingerir bebida alcoólica por pelo menos 12 horas;
- não fumar ou ingerir cafeína por 4 horas pelo menos;

- jejum de 6 horas, ou refeição leve nesse período;
- repouso em posição supina por 10 minutos no mínimo.

5.7 Utilização das técnicas de biologia molecular

5.7.1 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico

O DNA genômico dos pacientes foi extraído em triplicata, partindo-se de 200 uL de sangue total e utilizando-se o conjunto de reagentes de extração de DNA *QIAamp DNA Blood* (Qiagen Inc., Valencia, EUA). As amostras de DNA extraídas foram quantificadas no sistema Quibit (LifeTechnologies, Forest City, EUA), diluídas para 10 ng/µL, no próprio tampão de eluição do reagente utilizado, e armazenadas em congelador a -30 °C até o processamento.

5.7.2 Determinação dos *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) por pirosequenciamento

A determinação dos SNPs foi realizada por meio do sistema PyroMark Q24 (Qiagen Inc., Valencia, EUA), fundamentado no princípio de pirosequenciamento, sendo os iniciadores para a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a reação de pirosequenciamento construídos pelos pesquisadores deste projeto, utilizando o programa PyroMark Assay Desing

2.0 (Qiagen, Inc., Valencia, EUA) fornecidos pela Invitrogen (LifeTechnologies, Forest City, EUA).

A determinação dos SNPs foi realizada por meio do sistema PyroMark Q24 (Qiagen Inc., Valencia, EUA), fundamentado no princípio de pirosequenciamento, sendo os iniciadores para a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a reação de pirosequenciamento construídos pelos pesquisadores deste projeto, utilizando o programa PyroMark Assay Desing 2.0 (Qiagen, Inc., Valencia, EUA) fornecidos pela Invitrogen (LifeTechnologies, Forest City, EUA).

Na reação de PCR, cujo produto foi utilizado para a genotipagem no pirosequenciamento, seguiu-se o seguinte protocolo para cada reação: 12,5 µL de Pyromark PCR Master Mix; 2,5 µL de Coralload, 0,5 µL de iniciadores sense e antisense de 0,01 nM e 10 ng/µL de DNA, totalizando o volume final de 25 µL. Foram utilizados os seguintes ciclos térmicos no termociclador: denaturação inicial de 95 ºC por 15 minutos, seguida de 45 ciclos de amplificação (30 segundos a 94 ºC, 30 segundos na temperatura específica de cada gene analisado, e 30 segundos a 72 ºC, finalizando por 10 minutos a 72 ºC).

Após estas etapas de otimização da PCR (gradiente de temperatura e visualização em gel) para os SNPs avaliados, foi possível prosseguir com a realização das reações de pirosequenciamento para a determinação dos genótipos referentes a estes SNPs específicos, utilizando o método de pirosequenciamento anteriormente descrito.

5.7.3 Avaliação dos polimorfismos por pirosequenciamento e análise do tamanho de fragmento de restrição

Para todos os genes, exceto o ACE, o protocolo para reação de pirosequenciamento consistiu no preparo do produto de PCR por meio de um sistema de vácuo combinado com as etapas de fixação, denaturação e lavagem. Para a programação do aparelho Pyromark Q24 (Qiagen, Inc., Valencia, EUA) para genotipagem, utilizou-se programa de computador fornecido pelo fabricante, no qual é definida a sequência a ser analisada e a ordem de dispensação dos nucleotídeos. No aparelho, os seguintes reagentes foram carregados: mistura de enzimas, substrato e quatro desoxinucleotídeos (A,T,C,G). Durante o pirosequenciamento, os desoxinucleotídeos foram adicionados à cadeia de DNA presente no produto de PCR. A adição desses nucleotídeos à sequência de DNA gerou picos de luz registrados em gráfico e, posteriormente, traduzidos para o fenótipo do indivíduo.

Para o ACE, os fragmentos do DNA genômico contendo seus polimorfismos foram amplificados por PCR, sendo que os produtos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão (Trisborato-EDTA), corados com GelRed™ (Biotium), e visualizados no fotodocumentador, utilizando-se como referência marcador molecular de DNA. Para a detecção dos polimorfismos foi utilizada técnica de Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição. Após amplificação, os produtos de PCR gerados foram digeridos com a enzima de restrição

específica. Os produtos da digestão enzimática do *ACE* foram analisados por eletroforese em gel apropriado.

Selecionaram-se os seguintes genes para análise: *ACE* ID [55,71,74-78]; *AGT*: Met235Thr (rs699)[55]; AGTR1: A1166C (rs5186)[71,75,79]; *CYP11B2*: C-344T (rs1799998)[55,56,80-82]; ADD1: Gly460Trp[62,63,83]; *CYP17A1*: rs11191548[64-67]; CYP1A2 rs1378942[57,65,67]; *NPPA*: T2238C[68,69,72]; *FGF5*: rs16998073[57,65,67], *MTHFR* rs17367504[57,65,67]; c10orf107: rs1530440[57,67]; *ZNF652*: rs16948048[67]; *PLCD3*: rs12946454[67]. Para cada SNP analisado construíram-se dois iniciadores, sendo um deles obrigatoriamente marcado com biotina, totalizando 18 oligonucleotídeos ou iniciadores (Anexo D). O equilíbrio genético da população foi avaliado pela Lei de Hardy-Weinberg[97], sendo a mesma respeitada para todos os genes analisados.

5.7.4 Extração de ácido ribonucleico (RNA) de sangue periférico

O RNA total foi extraído utilizando-se o kit PAXgene™ (Blood RNA System, PreAnalytiX QIAGEN, GmbH, Alemanha). Todos os procedimentos foram realizados conforme o protocolo descrito pelo fabricante.

5.7.5 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

A quantificação da expressão de mRNA dos genes ACE, HIF-1 e VEGF em células mononucleadas do sangue periférico foi realizada por Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-

PCR) em tempo real utilizando-se o sistema de amplificação TaqMan RT-qPCR que apresentam sondas marcadas com fluoróforos de sinal (*reporter*) e bloqueador (*quencher*) do tipo MGB (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA).

O complemento do DNA (cDNA) foi sintetizado utilizando-se 1-3 µg de RNA, 200 ng deoligonucleotídeos aleatórios (randomprimers) (Invitrogen Corporation, Carlsbad,CA, EUA), DTT 20 mmoles/L (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), desoxinucleotídeos 200 moles/L (GE Healthcare do Brasil, Brasil), enzima SuperScriptTM II RT RNaseH 100-200 U e tampão RT (Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl2 3 mM) (InvitrogenCorporation, Carlsbad, CA, EUA), em volume final de 20 µL por reação, contendo água esterilizada e tratada com dietilpirocarboneto. O ensaio de RT-PCR realizou-se em aparelho Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com as seguintes etapas: 25 ºC por 10 minutos; 42 ºC por 50 minutos e 70 ºC por 15 minutos.

O cDNA obtido foi armazenado a –20 ºC até a realização da PCR. Os demais reagentes foram fornecidos em solução denominada Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, CA EUA) contendo MgCl2 25 mM, desoxinucleotídeos 10 mM, AmpEraseR UNG 30 U, enzima AmpliTaq Gold 150 U e tampão de reação (TaqMan® Universal PCR Master Mix), em volume final de 25 µL por reação.

A PCR em tempo real, ou PCR quantitativa, foi realizada seguindo as seguintes etapas: (1) um ciclo de 2 minutos a 50 °C (ativação da Enzima UNG); (2) um ciclo de 10 minutos a 95 °C (inativação da Enzima UNG); (3)

40 ciclos de 15 segundos a 95 °C (desnaturação) e 1 minuto a 60 °C (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados pelo equipamento ABI Prism 7500 Fast (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se o programa Sequence Detection Software versão 1.2.3 (AppliedBiosystems, Foster City, CA EUA) que gera curvas semilogaritímicas dos sinais de amplificação.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando-se a seleção de gene endógeno, escolhido de acordo com a avaliação de seis diferentes genes (GAPD, HRPT1, SDHS, HMBS, B2M e UBC) em dez amostras de cDNAs provenientes de pacientes dos grupos em análise. Após a reação de RT-PCR, os dados foram analisados no programa geNorm (PrimerDesignLtd.). O gene com menor variação entre as amostras foi escolhido como controle endógeno.

As eficiências das reações dos genes em estudo e controle endógeno foram determinadas utilizando-se como parâmetro o ciclo treshold[98]. Os resultados de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real foram comparados entre os grupos por meio da equação descrita por Livak e Schmittgen[99].

Análise Estatística

O presente estudo apresenta-se como análise transversal de pacientes hipertensos, avaliados de acordo com a presença de HAR e AOS. A inclusão de pacientes teve início em abril de 2011 e término em janeiro de 2013.

O número amostral foi calculado considerando-se a prevalência de AOS nos dois grupos, não-HAR (controle) e HAR, de acordo com o encontrado na literatura até o início do presente estudo. Conforme análises prévias citadas anteriormente, estima-se que a AOS esteja presente em aproximadamente 38% dos não-HAR[20] e em cerca de 64% dos HAR[23]. A partir dessas estimativas, considerando um nível de significância de 5% e poder estatístico de 95%, calculou-se o número mínimo da amostra de 93 para cada grupo, ou seja, total de 186 pacientes.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa IBM® SPSS® Statistics, versão 20 (IBM®, NY, EUA). Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas segundo a presença ou não de HAR. Para as variáveis qualitativas, calculou-se as frequências absolutas e relativas e a comparação entre proporções foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado de Pearson ou Teste exato de Fisher, caso houvesse frequências esperadas menores que 5. Os dados quantitativos foram analisados de acordo com a distribuição de cada variável. As variáveis com distribuição

aproximadamente Normal foram descritas em médias ± desvios padrão e comparadas utilizando-se o teste t de *Student* para amostras independentes. Nos casos em que a hipótese de distribuição Normal foi rejeitada, os dados foram resumidos em medianas e intervalos interquartis (percentis 25 e 75) e, então, comparados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. A verificação de normalidade de todas as variáveis quantitativas realizou-se com base em estatísticas descritivas, coeficientes de assimetria e curtose, histogramas, box-plots e gráfico normal de probabilidades (*Normal plot*).

Para avaliar o efeito da AOS sobre as variáveis observadas, os pacientes foram separados em grupos de acordo com o critério de classificação da AOS definido pela *American Academy of Sleep Medicine*[85]: sem apneia (IAH até 5 eventos/hora), apneia leve (IAH maior que 5 até 15 eventos/hora), moderada (IAH maior que 15 até 30 eventos/hora) ou grave (IAH maior que 30 eventos/hora). Para as comparações foi utilizado teste Qui-quadrado ou Fisher para as variáveis qualitativas e Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo método de comparações múltiplas de Tukey, para as variáveis quantitativas. A hipótese de igualdade de variâncias foi verificada pelo teste de Levene e, quando rejeitada, usou-se a correção de Brown-Forsythe e as comparações múltiplas de Dunnet. Para as variáveis quantitativas com distribuição não normal, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskall-Wallis.

Com o intuito de controlar possíveis fatores de confusão, as comparações entre grupos que mostraram diferenças estatisticamente significantes foram reanalisadas considerando-se a influência de covariáveis.

Para tanto, foram ajustados modelos de Análise de Covariância (ANCOVA), nos quais foram investigadas todas as interações entre variáveis.

O nível de significância considerado para os testes foi de 5% e todos os testes avaliaram hipóteses bilaterais.

Aspectos Éticos e Financiamento

Todos os procedimentos realizados estiveram de acordo com recomendações e diretrizes das principais sociedades específicas da área no país, tendo sido o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IDPC – processo 3849. Todos os pacientes que participaram do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado por este Comitê.

O material biológico (amostras de soro e amostras de ácidos nucleicos) foi armazenado no Laboratório de Biologia Molecular para estudos futuros; neste caso, após serem aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e com autorização do sujeito de pesquisa.

O suporte financeiro para a realização das análises genéticas e aquisição do Polissonígrafo Digital Alice 5 (Respironics - Royal Philips, Holanda) e do SphygmoCor (AtCor Medical, West Ryde, Austrália) foram provenientes da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com processo número 2010/07364-0.

Resultados

8.1 Caracterização da amostra - comparações entre pacientes com e sem hipertensão arterial resistente

Foram incluídos no estudo 205 pacientes hipertensos, sendo 105 com hipertensão resistente (grupo HAR) e 100 sem resistência ao tratamento anti-hipertensivo (grupo não-HAR). As características clínicas e dados de PA para o total de pacientes, e segundo a presença de HAR, estão descritos nas Tabelas 3 a 5.

Observou-se que entre pacientes com HAR havia predomínio do sexo feminino, maior proporção de raça não branca (pardos e negros), diabéticos, dislipidêmicos, antecedente pessoal de evento cerebrovascular e antecedente familiar de DAC. Além disso, notou-se neste grupo menor proporção de etilistas quando comparado ao não-HAR (Tabela 3).

Em relação à PA, o grupo HAR apresentou maiores médias de PA, tanto periférica quanto central, e menor descenso da PAS no sono comparado ao grupo não-HAR (Tabelas 4 e 5).

Entre os HAR, a análise da prevalência de fármacos em uso mostrou maior frequência de uso de anti-hipertensivos (Gráfico 2), assim como de ácido acetil salicílico, ezetimiba, metformina, insulina e alopurinol (Gráfico 3).

Tabela 3. Características clínicas dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes.

	Total n=205	Não-HAR n=100	HAR n=105	p-valor
Características demográficas				
Idade*, anos	55,4 ± 10,1	55,2 ± 10,7	55,5 ± 9,4	0,835
Sexo feminino, n (%)	115 (56)	48 (48)	67 (64)	0,025
Raça branca, n (%)	121 (59)	71 (71)	50 (48)	0,006
Dados antropométricos				
IMC*, kg/m^2	31,9 ± 6,6	31,2 ± 7,0	32,7 ± 6,2	0,117
CC*, cm	39,4 ± 4,2	39,4 ± 4,5	39,4 ± 4,1	0,947
CA*, cm	107,3 ± 14,5	106,4 ± 15,7	108,2 ± 13,4	0,412
CQ*, cm	109,4 ± 13,7	107,9 ± 14,7	110,6 ± 12,7	0,203
Antecedentes, n (%)				
Tabagismo	21 (10)	13 (13)	8 (8)	0,465
Etilismo	57 (28)	38 (38)	19 (18)	0,002
Atividade física	42 (20)	22 (22)	20 (19)	0,609
Diabetes	78 (38)	28 (28)	50 (48)	0,004
Dislipidemia	155 (76)	69 (69)	86 (82)	0,035
DAC	17 (8)	6 (6)	11 (10)	0,314
AVC / AIT	12 (6)	1 (1)	11 (10)	0,005
IAPC	4 (2)	1 (1)	3 (3)	0,622
AF de DAC	71 (35)	22 (22)	49 (47)	<0,001
AF de hipertensão arterial	125 (61)	58 (58)	67 (64)	0,474

Não-HAR = grupo não resistente; HAR = grupo com hipertensão arterial resistente; IMC = índice de massa corpórea; CC = circunferência cervical; CA = circunferência abdominal; CQ = circunferência do quadril; DAC = doença arterial coronária crônica; AVC = acidente vascular cerebral; AIT = ataque isquêmico transitório; IAPC = insuficiência arterial periférica crônica; AF = antecedente familiar.
* média ± desvio padrão.

Tabela 4. Pressão arterial no consultório e pela MAPA dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes.

	Total n=205	Não-HAR n=100	HAR n=105	p-valor
Pressão arterial no consultório				
PAS, mm Hg	147,5 ± 28,1	138,0 ± 19,3	156,6 ± 31,9	<0,001
PAD, mm Hg	87,9 ± 16,5	84,3 ± 13,3	91,3 ± 18,4	0,002
MAPA				
PAS 24h, mm Hg	132,5 ± 19,6	128,3 ± 14,2	136,4 ± 22,8	0,003
PAD 24h, mm Hg	79,7 ± 13,6	77,6 ± 9,8	81,6 ± 16,1	0,036
PAS vigília, mm Hg	135,1 ± 20,0	131,1 ± 14,5	138,7 ± 23,5	0,007
PAD vigília, mm Hg	82,3 ± 14,0	80,4 ± 10,2	84,1 ± 16,7	0,059
PAS sono, mm Hg	124,1 ± 19,9	118,7 ± 15,2	129,1 ± 22,5	<0,001
PAD sono, mm Hg	71,4 ± 13,1	68,8 ± 10,3	73,9 ± 14,8	0,005
Descenso PAS, %	8,1 ± 7,9	9,4 ± 7,1	6,9 ± 8,5	0,030
Descenso PAD, %	13,4 ± 9,2	14,3 ± 8,9	12,6 ± 9,5	0,209
Medicação HA	3,9 ± 2,1	2,2 ± 1,3	5,6 ± 1,2	< 0,001

Não-HAR = grupo não resistente; HAR = grupo com hipertensão arterial resistente; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; Medicação HA = número de fármacos anti-hipertensivos em uso.
Dados apresentados em média ± desvio padrão.

Tabela 5. Análise da pressão arterial central dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes.

	TOTAL n = 205	Não-HAR n = 100	HAR n = 105	p-valor
Índice de incremento, %	32,1 ± 13,1	31,7 ± 15,3	32,6 ± 10,6	0,702
VOP, m/s	8,8 ± 2,1	8,4 ± 1,6	8,8 (7,7-10,5)	0,160
Radial				
PAS, mm Hg	142,1 ± 23,5	132,3 ± 14,5	151,4 ± 26,6	< 0,001
PAD, mm Hg	82,9 ± 13,3	79,0 ± 8,9	86,7 ± 15,6	0,001
Aórtica				
PAS, mm Hg	132,5 ± 22,5	122,8 ± 14,5	141,6 ± 24,9	< 0,001
PAD, mm Hg	84,1 ± 13,5	80,1 ± 8,9	87,8 ± 15,9	0,001

Não-HAR = grupo não resistente; HAR = grupo com hipertensão arterial resistente; VOP = velocidade de onda de pulso; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica.
Dados apresentados em média ± desvio padrão.

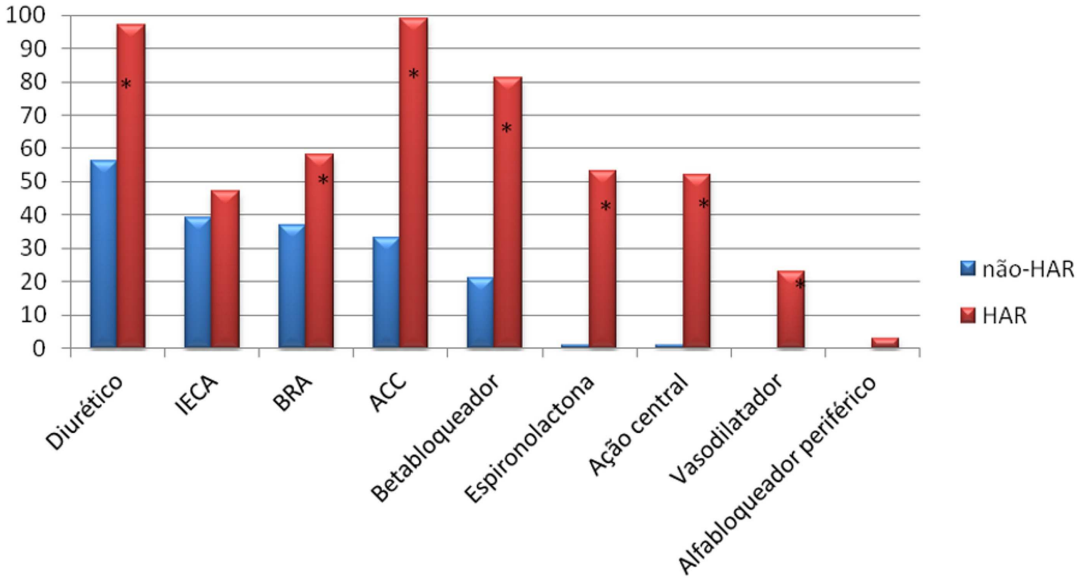

GRÁFICO 2. Fármacos anti-hipertensivos em uso pelos pacientes resistentes e não resistentes.
Não-HAR = grupo não resistente; HAR = grupo com hipertensão arterial resistente; IECA = inibidor da enzima conversora da angiotensina; BRA = bloqueador do receptor da angiotensina; ACC = antagonista dos canais de cálcio.
*p < 0,05 na comparação entre os grupos.

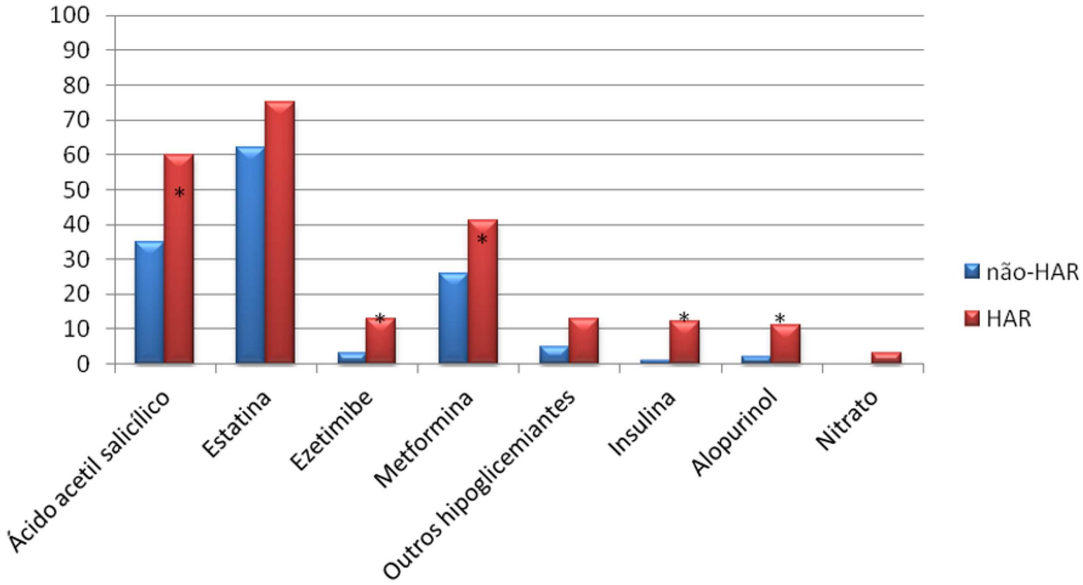

GRÁFICO 3. Fármacos não anti-hipertensivos em uso pelos pacientes resistentes e não resistentes.
Não-HAR = grupo não resistente; HAR = grupo com hipertensão arterial resistente.
*p < 0,05 na comparação entre os grupos.

Entre as características laboratoriais, no grupo HAR foram observados menores valores de colesterol total, LDL-colesterol, hemoglobina e hematócrito, além de taxas mais elevadas de HbA1c, transferrina e fibrinogênio (Tabelas 6 e 7). Com o intuito de verificar se as diferenças entre HAR e não-HAR em relação à HbA1c estariam associadas à idade, IMC, circunferência abdominal e presença de DM, as médias de HbA1c nos dois grupos foram novamente comparadas, levando-se em conta estas covariáveis. No modelo inicial em que foram incluídas idade, IMC e circunferência abdominal, a diferença se manteve estatisticamente significante (p= 0,031), indicando que pacientes HAR apresentavam maior média de HbA1c, independentemente da idade e composição corporal. No entanto, quando incluiu-se a DM, verificou-se que entre os não diabéticos não havia diferença entre HAR e não-HAR quanto à HbA1c (p= 0,304), porém, entre os diabéticos, a média de HbA1c no grupo HAR permaneceu maior que no grupo não-HAR (p= 0,002).

Já em relação à inflamação sistêmica e às características hormonais do sistema renina-angiotensina-aldosterona, os pacientes do grupo HAR apresentaram maiores taxas de aldosterona, C4 e PCR-us (Tabela 7). Após ajuste por sexo, idade e IMC, as diferenças permaneceram significantes para a aldosterona (p = 0,001) e o C4, sendo que para este último, após controle por dislipidemia e DM, o achado ainda continuou significante (p= 0,043). Em relação ao PCR-us, após ajuste por sexo, idade e IMC, a diferença se manteve entre os homens (p < 0,001), mas não entre as

mulheres (p= 0,195). Entretanto, após ajuste para DM e dislipidemia, a diferença entre os grupos passou a ser não significante (p= 0,093).

Tabela 6. Características metabólicas dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes.

	TOTAL n = 205	**Não-HAR n = 100**	**HAR n = 105**	**p-valor**
Col total, mg/dL*	175,5 ± 37,8	182,3 ± 40,2	169,1 ± 34,3	0,012
Triglicérides†, mg/dL	133,5 (93,5-182,7)	140 (100,0-190,0)	124 (90,0-180,5)	0,166
HDL-col, mg/dL*	44,9 ± 13,0	45,4 ± 14,1	44,5 ± 12,0	0,620
LDL-col, mg/dL*	100,5 ± 34,7	106,1 ± 35,9	95,3 ± 32,8	0,025
ApoB/ApoA1, mg/dL*	0,71 ± 0,23	0,74 ± 0,25	0,68 ± 0,21	0,065
GJ, mg/dL†	95 (88,0-107,0)	95 (87,0-102,0)	96 (89,0-114,0)	0,117
HbA1c, %*	6,2 ± 1,1	6,0 ± 0,7	6,4 ± 1,3	0,007
HOMA IR, %†	2,5 (1,6-3,5)	2,3 (1,5-3,3)	2,6 (1,8-4,2)	0,068
HOMA B, %†	32,1 (22,1-47,6)	31,9 (19,5-47,6)	32,5 (23,8-47,9)	0,468
Leptina, ng/mL†	23,4 (10,4-42,3)	21,2 (10,6-41,0)	25,8 (8,8-44,7)	0,777

Não-HAR= grupo não resistente; HAR= grupo com hipertensão arterial resistente; Col= colesterol; ApoB= Apolipoproteína B; ApoA1= Apolipoproteína A1; GJ= glicemia de jejum; HbA1C= hemoglobina glicada; HOMA B= *Homeostasis Model Assesment* Beta; HOMA IR= *Homeostasis Model Assesment IR*.
* média ± desvio padrão; † mediana (p25-p75)

Tabela 7. Perfil inflamatório, renal e hormonal dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes.

	TOTAL n = 205	Não-HAR n = 100	HAR n = 105	p-valor
Ácido úrico, mg/dL*	5,9 ± 1,6	5,9 ± 1,6	6,0 ± 1,7	0,437
C3, mg/dL*	113,7 ± 26,9	112,0 ± 25,3	115,6 ± 28,8	0,380
C4, mg/dL*	23,0 ± 7,6	21,7 ± 6,9	24,4 ± 8,1	0,021
PCR-us, mg/L†	3,9 (1,2-8,0)	2,3 (0,9-7,0)	6,0 (1,8-9,0)	0,016
Hemoglobina, g/dL*	13,7 ± 1,5	13,9 ± 1,5	13,5 ± 1,4	0,022
Hematócrito, %*	41,8 ± 3,7	42,4 ± 3,7	41,2 ± 3,7	0,014
Ferritina, ng/mL†	115,4 (45,9-201,1)	136,9 (57,8-211,2)	90 (36,8-201,1)	0,059
Ferro, µg/dL*	84,1 ± 27,6	86,3 ± 28,0	81,8 ± 27,0	0,244
Transferrina, mg/dL*	256,8 ± 36,1	250,9 ± 38,8	262,5 ± 32,4	0,025
Fibrinogênio, mg/dL*	296,1 ± 69,5	282,8 ± 63,6	309,6 ± 72,9	0,008
Creatinina, mg/dL*	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,453
TFG, mL/min*	98,7 ± 27,4	99,2 ± 25,8	98,2 ± 28,9	0,797
Aldosterona, ng/mL†	6,4 (3,1-11,2)	5,6 (2,4-9,5)	7,4 (3,3-12,8)	0,010
ARP, ng/mL/h†	2,5 (0,6-6,2)	1,9 (0,6-5,9)	2,5 (0,5-9,0)	0,593
Aldo/ARP†	2,3 (0,8-6,7)	2,2 (0,7-5,8)	2,9 (0,9-7,7)	0,344
Potássio, mEq/mL*	4,0 ± 0,4	4,0 ± 0,3	4,0 ± 0,5	0,800
TSH, uIU/mL	1,8 (1,2-2,8)	1,9 (1,2-3,1)	1,7 (1,1-2,6)	0,318
BNP, pg/mL†	10,1 (5,1-21,8)	9,8 (5,3-16,7)	10,7 (4,9-30,8)	0,434

Não-HAR= grupo não resistente; HAR= grupo com hipertensão arterial resistente; PCR-us= proteína C reativa ultrassensível; TFG= taxa de filtração glomerular calculada pela fórmula de Cockcroft-Gault; ARP= atividade da renina plasmática; Aldo/ARP= relação aldosterona / ARP; TSH= hormônio tireoestimulante; BNP= peptídeo natriurético tipo B.
* média ± desvio padrão; † mediana (p25-p75)

Na avaliação do sono, não foram encontradas diferenças significantes em relação ao uso de indutores do sono entre os grupos HAR e não-HAR (2% e 7% respectivamente, p= 0,175) e na Escala de Sonolência de Epworth (10,6 ± 5,3 vs. 10,0 ± 6,2, p= 0,412). De acordo com o Questionário de Berlim, ambos os grupos apresentaram 80% de prevalência de pacientes com alto risco para AOS (sem diferença significativa).

Após a polissonografia, o grupo HAR revelou ter maior latência para a fase de sono *Rapid Eye Movement* (REM) (valor de referência: entre 70 e 120 minutos[100]), e a eficiência do sono (razão entre o tempo total de sono e o tempo disponibilizado para dormir, ou o tempo “na cama” – valor de referência: maior que 85%[100]) foi menor quando comparada ao grupo não-HAR (Tabela 8). Também houve diferença quanto aos índices de movimentos periódicos dos membros (PLM), sugerindo que a movimentação de membros é maior entre os pacientes sem hipertensão resistente. Quando analisada apenas a positividade dos índices PLM (valores maiores que zero), verificou-se que o grupo não-HAR apresentou maior proporção de pacientes com índices PLM positivos (78% vs. 64% do grupo HAR, p= 0,026, para o índice PLM e 76% vs. 57% do grupo HAR, p= 0,004, para o índice PLM associado a despertar). Tais diferenças permaneceram significantes, após controle por sexo, idade e dados laboratoriais (hemoglobina, hematócrito, taxa de filtração glomerular, ferro, ferritina e transferrina).

Tabela 8. Avaliação do sono dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes.

	TOTAL n = 205	Não-HAR n = 100	HAR n = 105	p-valor
Apneia (IAH > 15), %	64 (31)	28 (28)	36 (34)	0,367
IAH, eventos/h†	7,0 (1,9-21,9)	5,8 (1,6-16,9)	8,9 (2,1-24,5)	0,308
SpO_2 basal, %*	96,3 ± 1,9	96,2 ± 1,5	96,4 ± 2,3	0,433
SpO_2 média, %*	94,0 ± 2,8	93,9 ± 2,6	94,1 ± 2,9	0,601
SpO_2 mínima, %*	81,7 ± 12,0	81,7 ± 11,9	81,6 ± 12,2	0,934
Tempo SpO_2 < 90%, min†	2,5 (0-19,0)	3,0 (0-19,0)	2,0 (0-21,0)	0,469
Latência do sono, min†	12,5 (6,5-21,0)	11,5 (6,5-19,4)	13,5 (6,5-22,0)	0,174
Eficiência do Sono, %*	75,7 ± 13,7	78,1 ± 11,2	73,5 ± 15,5	0,016
Índice de despertar, %†	17,0 (11,9-27,2)	17,5 (12,6-25,3)	16,6 (10,8-29,4)	0,660
Tempo acordado, min*	73,0 ± 42,1	65,5 ± 33,0	80,2 ± 48,4	0,094
Estágio N1, %†	13,8 (8,4-19,6)	13,3 (8,5-17,9)	14,3 (8,2-20,8)	0,400
Estágio N2, %*	50,4 ± 11,2	51,7 ± 9,9	49,2 ± 12,2	0,107
Estágio N3, %*	18,1 ± 8,4	17,2 ± 7,6	18,9 ± 9,1	0,151
Sono REM, %*	15,7 ± 7,2	16,4 ± 7,0	14,9 ± 7,4	0,151
Latência do REM, min*	133,7 ± 77,4	120,3 ± 70,8	146,6 ± 81,7	0,016
Índice PLM, eventos/h†	0,7 (0-2,2)	1,0 (0,2-2,1)	0,3 (0-2,2)	0,054
Índice PLM associados a despertar, eventos/h†	0,4 (0-1,3)	0,7 (0,2-1,5)	0,2 (0-1,3)	0,020

Não-HAR= grupo não resistente; HAR= grupo com hipertensão arterial resistente; IAH= índice de apneia e hipopneia (eventos/hora); SpO_2= saturação da oxi-hemoglobina; REM= Rapid Eye Movement; PLM= movimento periódico dos membros.
* média ± desvio padrão; † mediana (p25-p75)

8.2 A apneia obstrutiva do sono nos pacientes hipertensos

Considerando o total de 205 pacientes, observou-se que o IAH, utilizado para diagnóstico da AOS, variou entre 0 e 118 eventos/hora, com mediana de 7 eventos/hora. A distribuição dos pacientes quanto ao IAH

apresentada no Gráfico 4, revela que houve grande concentração de pacientes com IAH inferior a 10 eventos/hora.

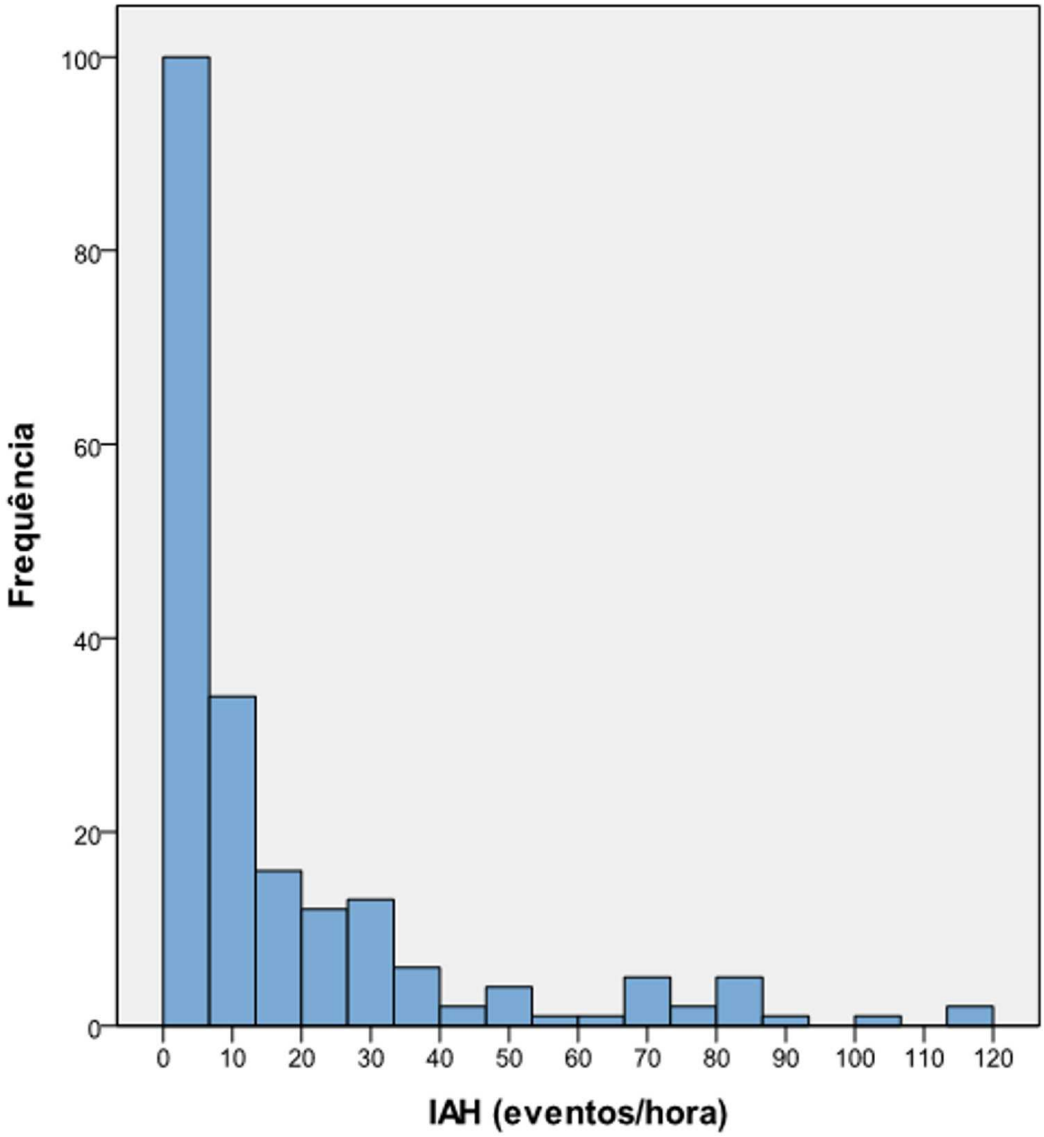

GRÁFICO 4. Distribuição dos pacientes de acordo com índice de apneia e hipopneia.
IAH= índice de apneia e hipopneia.

De acordo com o critério de classificação da AOS definido pela *American Academy of Sleep Medicine*[89] verificou-se que, do total de

pacientes, 91 (44,4%) não tinham apneia (IAH até 5 eventos/hora), 50 (24,4%) tinham apneia leve (IAH maior que 5 até 15 eventos/hora), 30 pacientes (14,6%) tinham apneia moderada (IAH maior que 15 até 30 eventos/hora) e 34 pacientes (16,6%) tinham apneia considerada grave (IAH maior que 30 eventos/hora).

Apesar de ter sido observado percentual pouco maior de pacientes com apneia no grupo HAR, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos HAR e não-HAR quanto à classificação da AOS (p= 0,242, Gráfico 5). Também não houve diferença entre os grupos quando analisada apenas a presença de apneia de qualquer gravidade (p= 0,195) ou somente apneia moderada ou grave (p= 0,332).

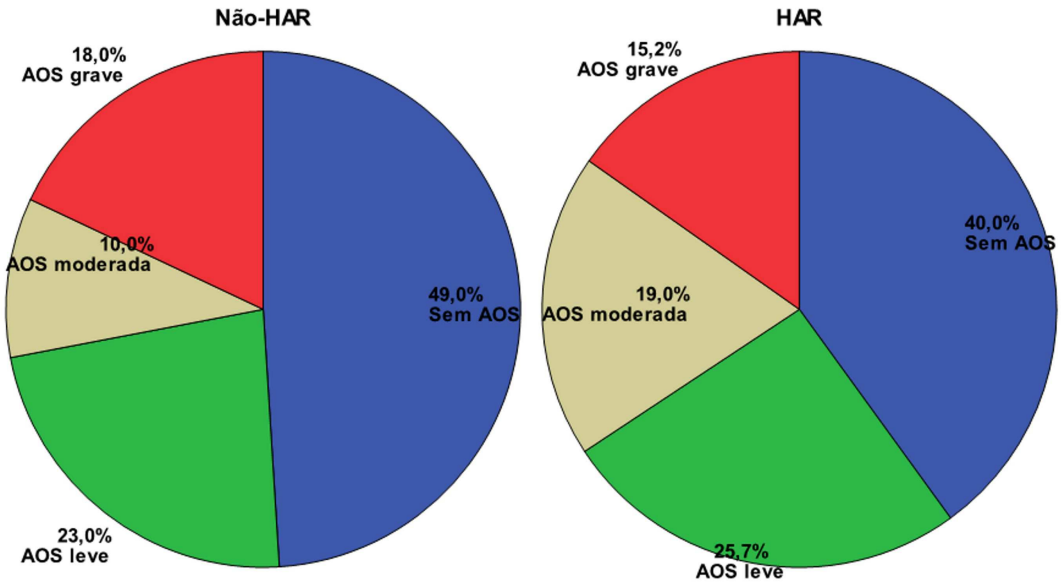

GRÁFICO 5. Distribuição dos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes quanto à classificação da apneia (p= 0,242 para as comparações entre os dois grupos).
Não-HAR= grupo não resistente; HAR= grupo com hipertensão arterial resistente; AOS= apneia obstrutiva do sono.

A avaliação do sono, de acordo com o IAH, evidenciou que pacientes com AOS grave apresentaram menores valores médios e mínimos de SpO_2, e maior tempo com SpO_2 abaixo de 90%, quando comparados aos demais grupos. A qualidade do sono também se apresentou prejudicada nos pacientes com AOS grave, demonstrada pelo maior índice de despertar e de sono estágio N1, e menor tempo em sono estágio N3. Estes resultados estão apresentados no Anexo E.

8.3 Efeito da apneia sobre o controle da pressão arterial, metabolismos glicídico e lipídico, e atividade inflamatória

Para entender a relação entre a AOS e as demais variáveis observadas, os quatro grupos (apneia ausente, leve, moderada e grave) foram comparados em relação a características clínicas, pressão arterial, perfil glicídico, lipídico e inflamatório.

Conforme o esperado, a elevação do IAH se mostrou claramente associada ao aumento de valores relacionados à composição corporal. Os pacientes com apneia de qualquer gravidade tiveram, em média, maior IMC e maiores medidas de circunferências cervical, abdominal e de quadril, além de maior taxa de obesidade quando comparados aos pacientes sem apneia. Entre os pacientes com apneia (seja leve, moderada ou grave), não houve diferença quanto ao IMC; mas foi observado que os pacientes com AOS grave apresentaram maior circunferência abdominal em relação àqueles

com AOS leve e maiores circunferências cervical e de quadril que os pacientes com AOS leve ou moderada (Tabela 9).

Em relação ao sexo, constatou-se que pacientes com AOS grave apresentaram maior proporção de homens quando comparados aos outros três grupos de apneia. Curioso notar que pacientes com AOS (de qualquer gravidade) relataram fazer mais atividade física que os sem AOS.

As prevalências de uso de medicações entre os grupos foram verificadas de acordo com a gravidade da apneia, porém nenhuma diferença significante foi observada.

Tabela 9. Características clínicas dos pacientes de acordo com a classificação da apneia.

	Sem AOS n = 91	AOS leve n = 50	AOS mod n = 30	AOS grave n = 34
Características demográficas				
Idade*, anos	53,0 ± 10,9	57,4 ± 9,0	57,3 ± 9,2	56,8 ± 8,7
Sexo feminino, %	59 (65)	28 (56)	17 (57)	11 (32) [a,b,c]
Raça branca, %	55 (60)	33 (66)	15 (50)	18 (53)
Dados antropométricos				
IMC*, kg/m^2	29,2 ± 5,8	33,2 ± 6,0[a]	33,7 ± 6,3[a]	36,1 ± 6,8[a]
Obesidade, n (%)	39 (43)	35 (70)[a]	20 (67)[a]	28 (82)[a]
CC*, cm	37,3 ± 3,3	40,2 ± 3,7[a]	40,2 ± 3,8[a]	43,0 ± 4,5[a,b,c]
CA*, cm	100,5 ± 13,7	109,4 ± 11,5[a]	110,9 ± 12,6[a]	119,3 ± 12,5[a,b]
CQ*, cm	102,9 ± 11,9	111,7 ± 10,9[a]	111,1 ± 12,3[a]	120,7 ± 14,4[a,b,c]
Antecedentes				
Tabagismo, %	10 (11)	3 (6)	4 (13)	4 (12)
Etilismo, %	21 (23)	14 (29)	11 (37)	11 (32)
Atividade física, %	10 (11)	14 (28)[a]	9 (30)[a]	9 (26)[a]
Diabetes, %	32 (35)	18 (36)	12 (40)	16 (47)
Dislipidemia, %	64 (70)	41 (82)	24 (80)	26 (76)
DAC, %	7 (8)	5 (10)	2 (7)	3 (9)
AVC / AIT, %	4 (4)	4 (8)	2 (7)	2 (6)
IAPC, %	1 (1)	2 (4)	1 (3)	-
AF de DAC, %	34 (37)	17 (34)	12 (40)	8 (23)
AF de hipertensão arterial, %	62 (68)	30 (60)	16 (53)	17 (50)

AOS= apneia obstrutiva do sono; mod= moderada; IMC= índice de massa corpórea; CC= circunferência cervical; CA= circunferência abdominal; CQ= circunferência do quadril; DAC= doença arterial coronária crônica; AVC = acidente vascular cerebral; AIT= ataque isquêmico transitório; IAPC= insuficiência arterial periférica; AF= antecedente familiar.
* média ± desvio padrão.
[a] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo sem AOS; [b] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com AOS leve; [c] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com AOS moderada

8.3.1 Efeito da apneia sobre a pressão arterial

No grupo com apneia leve, a análise da PA, de acordo com a classificação da AOS, evidenciou menores valores de PAD na vigília e sono quando comparado ao grupo sem apneia (Tabela 10). Por sua vez, os pacientes com apneia grave apresentaram menor descenso do sono da PAD quando comparados com aqueles com apneia moderada e estes, por sua vez, maior descenso quando contrapostos aos grupos sem apneia e com apneia leve. Constatou-se que a PAS medida no consultório diminuiu de acordo com a gravidade da apneia; no entanto a diferença não foi significante estatisticamente (p= 0,778).

Quando se analisou apenas a presença de AOS, independentemente da gravidade, verificou-se que não houve diferença entre pacientes com e sem apneia quanto à PAS, seja medida no consultório ou na MAPA, mas pacientes com apneia apresentaram menores valores de PAD nas 24 horas (77,4 vs. 82,7 mm Hg, p = 0,006), na vigília (85,4 vs. 79,9 mm Hg, p= 0,006) e durante o sono (74,6 vs. 69,0 mm Hg, p= 0,004).

Tabela 10. Pressão arterial (em mm Hg) no consultório e pela MAPA dos pacientes de acordo com a classificação da apneia.

	Sem AOS n = 91	AOS leve n = 50	AOS mod n = 30	AOS grave n = 34
Pressão arterial no consultório				
PAS	149,5 ± 30,6	147,7 ± 26,1	145,2 ± 21,4	144,2 ± 29,7
PAD	89,7 ± 17,7	86,2 ± 16,0	83,4 ± 12,3	89,5 ± 16,4
MAPA				
PAS 24h	134,2 ± 22,3	130,3 ± 17,3	131,9 ± 16,8	131, 7 ± 17,4
PAD 24h	82,7 ± 15,2	76,7 ± 11,9	77,9 ± 12,4	77,9 ± 11,3
PAS vigília	136,8 ± 22,6	132,4 ± 17,6	135,7 ± 17,9	134,1 ± 18,1
PAD vigília	85,4 ± 15,5	79,1 ± 12,6[a]	81,1 ± 13,2	80,2 ± 11,4
PAS sono	126,2 ± 22,6	122,7 ± 18,7	120,5 ± 16,4	123,7 ± 16,8
PAD sono	74,6 ± 14,6	68,6 ± 10,3[a]	67,7 ± 11,5	70,4 ± 12,1
Descenso PAS, %	7,7 ± 7,9	7,1 ± 8,7	11,9 ± 7,1	7,5 ± 6,7
Descenso PAD, %	12,7 ± 9,0	12,8 ± 8,1	18,5 ± 11,5[a,b]	12,4 ± 8,5[c]
Medicação HA	3,8 ± 2,3	3,9 ± 1,8	4,0 ± 2,3	3,9 ± 1,9

AOS= apneia obstrutiva do sono; mod= moderada; MAPA = monitorização ambulatorial da pressão arterial; PAS= pressão arterial sistólica em mm Hg; PAD= pressão arterial diastólica em mm Hg; Medicação HA = número de fármacos anti-hipertensivos em uso.
Dados apresentados em média ± desvio padrão[a] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo sem [a] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo sem AOS; [b] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com AOS leve; [c] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com AOS moderada

A associação entre a AOS e a redução na PAD (nas 24 horas, vigília e sono) foi novamente analisada, considerando-se as características clínicas que se mostraram associadas à apneia (sexo, IMC e atividade física) e a presença de HAR como variável de controle. As medidas de circunferência (cervical, cintura e quadril) não foram levadas em conta por serem muito correlacionadas com o IMC. Em todos os modelos identificaram-se interações significantes entre AOS e sexo e entre AOS e HAR, indicando que o efeito da AOS sobre a PAD depende do gênero e da presença de HAR. Os resultados apresentados na Tabela 11 mostram que a presença da

AOS está relacionada à menor PAD apenas nas mulheres e em pacientes com HAR.

Tabela 11. Efeito da apneia sobre a pressão arterial diastólica medida pela monitorização arterial da pressão arterial nas 24 horas, na vigília e no sono.

	Sem AOS n = 91	Com AOS n = 114	p-valor
PAD 24h, mm Hg			
Homens	80,1 ± 13,1	81,5 ± 12,8	0,632
Mulheres	83,2 ± 12,7	74,3 ± 13,1	0,001
Grupo não-HAR	76,2 ± 12,9	77,2 ± 13,2	0,695
Grupo HAR	87,1 ± 18,8	78,6 ± 13,4	0,002
PAD vigília, mm Hg			
Homens	83 ± 14,2	84,4 ± 12,8	0,652
Mulheres	85,6 ± 13,5	76,7 ± 13,8	0,001
Grupo não-HAR	79,1 ± 13,6	79,9 ± 13,2	0,764
Grupo HAR	89,6 ± 19,7	81,2 ± 13,4	0,004
PAD sono, mm Hg			
Homens	72,7 ± 12,6	71,9 ± 12,1	0,772
Mulheres	75,5 ± 12	66,2 ± 13,1	< 0,001
Grupo não-HAR	68,4 ± 12,9	67,8 ± 12,5	0,802
Grupo HAR	79,8 ± 18,8	70,3 ± 12,6	< 0,001

AOS = apneia obstrutiva do sono; MAPA = monitorização ambulatorial da pressão arterial; PAD = pressão arterial diastólica.
Dados apresentados em média ± desvio padrão, controlado pelo índice de massa corpórea – estimativas obtidas nos modelos ANCOVA. Atividade física não foi significante em nenhum modelo.

Na avaliação da pressão central (Tabela 12), não houve diferença entre os grupos quanto ao índice de incremento, VOP e pressões radial e aórtica aferidas pela tonometria.

Tabela 12. Análise da pressão arterial central dos pacientes de acordo com a classificação da apneia.

	Sem AOS n = 91	AOS leve n = 50	AOS mod n = 30	AOS grave n = 34
Índice de incremento, %	33,9 ± 11,9	31,7 ± 13,5	30,2 ± 8,9	30,3 ± 17,5
VOP*, m/s	8,3 (7,5-10)	8,8 (7,7-10,2)	8,1 (7,0-8,9)	9,9(8,3-10,4)
Radial				
PAS, mm Hg	141,0 ± 23,7	142,8 ± 20,7	144,1 ± 26,3	142,0 ± 26,3
PAD, mm Hg	82,3 ± 11,6	82,6 ± 13,9	79,5 ± 12,7	87,7 ± 16,2
Aórtica				
PAS, mm Hg	131,8 ± 21,1	133,6 ± 21,0	132,7 ± 24,6	132,3 ± 27,1
PAD, mm Hg	83,5 ± 11,9	83,8 ± 13,9	80,6 ± 12,8	88,6 ± 16,5

AOS = apneia obstrutiva do sono; mod = moderada; VOP = velocidade de onda de pulso.
Dados apresentados em média ± desvio padrão exceto por VOP (*) em mediana (p25-p75).

8.3.2 Efeito da apneia sobre o metabolismo glicídico e lipídico

Na análise das variáveis metabólicas, observou-se que a AOS associou-se à piora da resistência insulínica, pois pacientes com AOS moderada ou grave apresentam maiores valores de HOMA IR do que pacientes sem AOS (Tabela 13). Entretanto, quando consideramos outras variáveis (sexo, IMC e HAR), as diferenças entre os grupos deixam de ser significantes ($p= 0,405$). Isto pode ser explicado pela correlação entre o IMC e HOMAIR ($r= 0,459$, $p < 0,001$), ou seja, o efeito da AOS foi detectado apenas porque os pacientes com AOS têm maior IMC. Não foram encontradas outras diferenças significantes dentre as variáveis metabólicas.

Tabela 13. Características metabólicas dos pacientes hipertensos de acordo com a classificação da apneia.

	Sem AOS n = 91	AOS leve n = 50	AOS mod n = 30	AOS grave n = 34
Col total, mg/dL*	176,0 ± 35,7	174,7 ± 43,7	186,6 ± 37,4	165,3 ± 32,2
Triglicérides†, mg/dL	117,0 (88,0-163)	140,0 (92,0-188,0)	148,0 (106,0-226,0)	151,0 (109,0-209,0)
HDL-col, mg/dL*	46,7 ± 13,5	45,9 ± 12,8	42,2 ± 12,6	41,1 ± 11,9
LDL-col, mg/dL*	103,2 ± 33,3	95,4 ± 39,3	110,9 ± 33,9	91,4 ± 28,9
ApoB/ApoA1, mg/dL*	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2
GJ, mg/dL†	93,0 (87,0-102,0)	97,0 (89,0-103,0)	100,0 (89,0-124,0)	95,0 (91,0-110,0)
HbA1c, %*	6,1 ± 1,2	6,2 ± 0,9	6,6 ± 1,3	6,3 ± 0,7
HOMA IR – valores em log, %†	0,30 ± 0,28	0,40 ± 0,25	0,53 ± 0,36 [a]	0,46 ± 0,24 [a]
HOMA B, %†	28,2 (19,4-42,5)	34,5 (22,5-43,3)	37,6 (28,9-60,2)	44,4 (27,6-53,4)
Leptina, ng/mL†	22,3 (8,8-42,3)	16,8 (8,9-44,7)	25,8 (13,9-38,7)	35,8 (16,5-44,0)

AOS= apneia obstrutiva do sono; mod= moderada; Col= colesterol; ApoB= Apolipoproteína B; ApoA1= Apolipoproteína A1; GJ= glicemia de jejum; HbA1C= hemoglobina glicada; HOMA IR= *Homeostasis Model Assesment IR*; HOMA B= *Homeostasis Model Assesment Beta*.
* média ± desvio padrão; † mediana (p25-p75).
[a] p <0,05 quando comparado ao grupo sem AOS; [b] p < 0,05 quando comparado ao grupo com AOS leve; [c] p < 0,05 quando comparado ao grupo com AOS moderada.

8.3.3 Efeito da apneia sobre a atividade inflamatória

A Tabela 14 mostra as comparações entre as classes da AOS em relação à atividade inflamatória. No Gráfico 6, pode-se notar aumento gradativo dos valores de ácido úrico; no entanto, foram detectadas diferenças significantes apenas entre os extremos (sem AOS e AOS grave). Após ajuste por sexo, IMC e presença de HAR, o efeito da AOS sobre o ácido úrico perdeu a significância (p= 0,300). Porém, convém ressaltar que o grupo de pacientes com AOS grave apresentou maior proporção de homens

e que estes tiveram, em média, ácido úrico mais elevado que as mulheres (6,7 ± 1,7 mg/dL vs. 5,4 ± 1,4 mg/dL, p < 0,001).

Tabela 14. Perfil inflamatório, renal e hormonal dos pacientes hipertensos de acordo com a classificação da apneia.

	Sem AOS n = 91	AOS leve n = 50	AOS mod n = 30	AOS grave n = 34
Ácido úrico, mg/dL*	5,6 ± 1,5	5,9 ± 1,2	6,4 ± 1,5	6,7 ± 2,2[a]
C3, mg/dL*	107,1 ± 28,5	116,9 ± 26,5	117,5 ± 21,5	122,8 ± 24,6 [a]
C4, mg/dL*	20,6 ± 6,2	24,5 ± 7,8 [a]	24,9 ± 9,6 [a]	25,2 ± 7,7 [a]
PCR-us, mg/L†	2,1 (0,8-6,0)	5,0 (1,4-8,4)	6,0 (2,3-10,0)	6,0 (1,5-9,5)
Hemoglobina, g/dL*	13,7 ± 1,5	13,8 ± 1,4	13,5 ± 1,4	14,1 ± 1,5
Hematócrito, %*	41,7 ± 3,6	41,6 ± 3,9	41,4 ± 3,8	42,6 ± 3,6
Ferritina, ng/mL†	98,3 (42,7-201,0)	128,6 (57,8-207,0)	119,3 (80,6-181,1)	132,3 (44,4-211,2)
Ferro, µg/dL*	86,8 ± 30,3	82,4 ± 23,9	79,6 ± 22,4	83,2 ± 29,5
Transferrina, mg/dL*	260,4 ± 42,0	250,5 ± 33,0	256,3 ± 28,2	257,1 ± 28,7
Fibrinogênio, mg/dL*	279,6 ± 66,2	301,4 ± 62,9	318,5 ± 69,4	315,3 ± 79,2
Creatinina, mg/dL*	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3
TFG, mL/min*	95,6 ± 26,1	99,5 ± 26,2	98,1 ± 32,5	106,5 ± 27,6
Potássio, mEq/mL*	4,0 ± 0,4	4,0 ± 0,4	4,1 ± 0,3	3,9 ± 0,3
Aldosterona, ng/mL†	5,8 (2,5-11,9)	6,9 (3,6-11,2)	6,6 (3,2-10,1)	5,3 (2,3-8,7)
ARP, ng/mL/h†	1,6 (0,4-4,9)	2,7 (0,7-10,1)	3,8 (1,2-12,9)	2,6 (0,5-6,4)
Aldo/ARP†	3,6 (1,5-8,6)	2,2 (0,7-7,9)	1,6 (0,3-4,3)	2,2 (0,7-4,8)
TSH, uIU/mL	2,5 ± 2,1	1,9 ± 1,2	2,1 ± 0,9	2,7 ± 4,1
BNP, pg/mL†	9,1 (3,2-19,4)	11,3 (5,1-21,3)	8,8 (5,6-24,3)	11,2 (5,9-32,2)

Não-HAR= grupo não resistente; HAR= grupo com hipertensão arterial resistente; PCR-us= proteína C reativa ultrassensível; TFG = taxa de filtração glomerular calculada pela fórmula de Cockcroft-Gault; ARP= atividade da renina plasmática; Aldo/ARP= relação aldosterona / ARP; TSH= hormônio tireoestimulante; BNP= peptídeo natriurético tipo B.
* média ± desvio padrão; † mediana (p25-p75).
[a] p < 0,05 quando comparado ao grupo sem AOS.

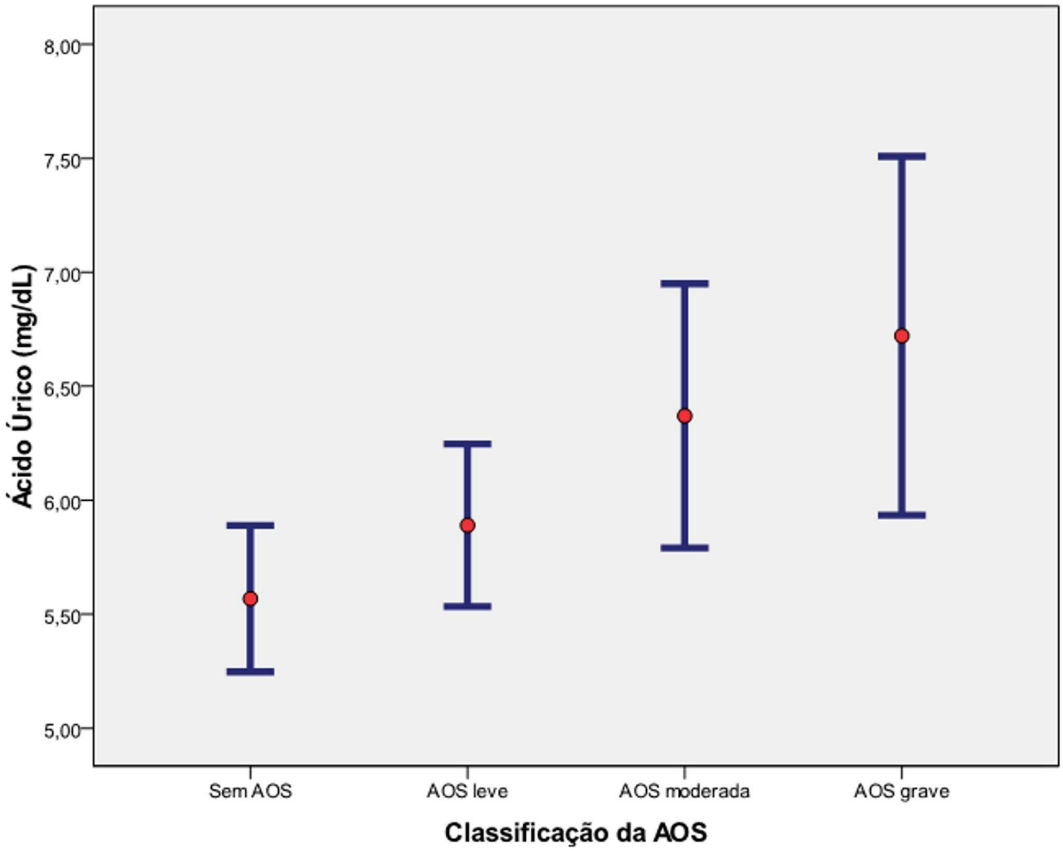

GRÁFICO 6. Ácido úrico de acordo com a classificação da apneia - Intervalos de confiança de 95% para as médias.
AOS= apneia obstrutiva do sono.

Também foram encontradas diferenças em relação a C3 e C4, cujos intervalos de confiança de 95% para as médias estão representados nos Gráficos 7 e 8. Para o C3, foi observada maior média entre os pacientes com apneia grave, quando comparados aos pacientes sem apneia; e, para o C4, independentemente do grau, os pacientes com apneia apresentaram maiores médias do que a encontrada entre os pacientes sem apneia. As diferenças permaneceram significantes, mesmo após controle por sexo, IMC, HAR, dislipidemia e DM para o C4 (p= 0,019), mas não de forma robusta para o C3 (p= 0,098).

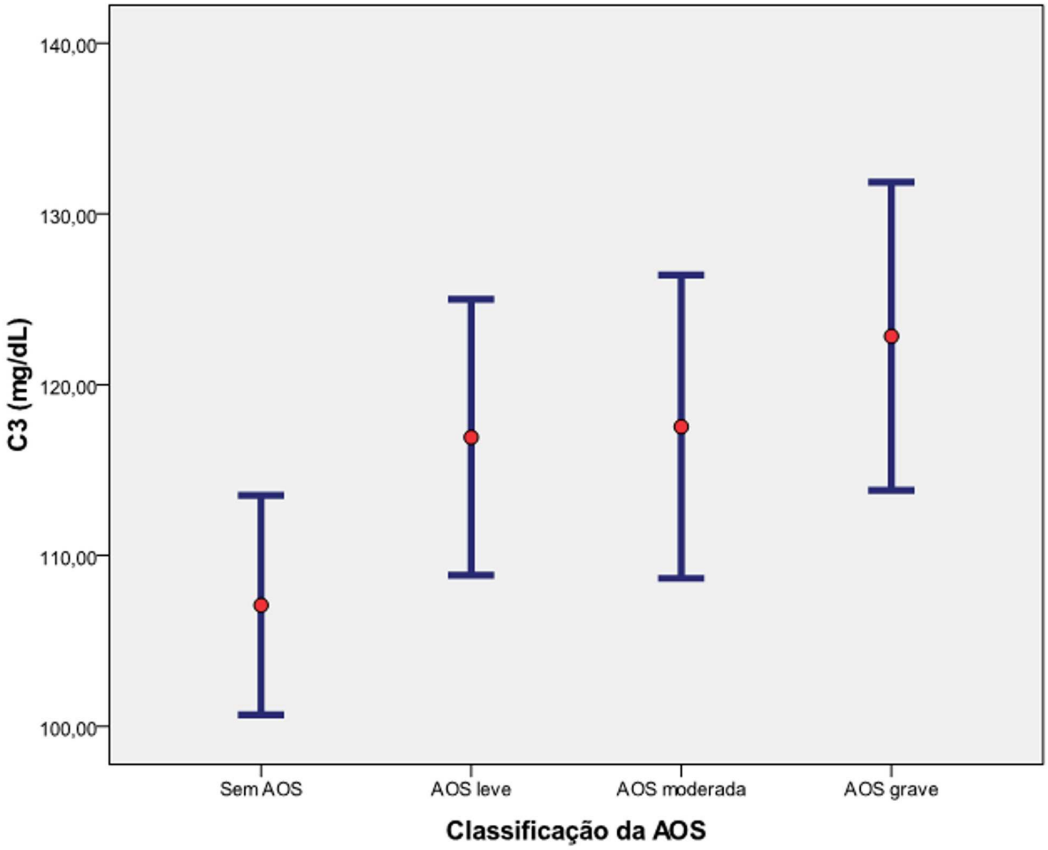

GRÁFICO 7. C3 de acordo com a classificação da apneia - Intervalos de confiança de 95% para as médias.
AOS= apneia obstrutiva do sono.

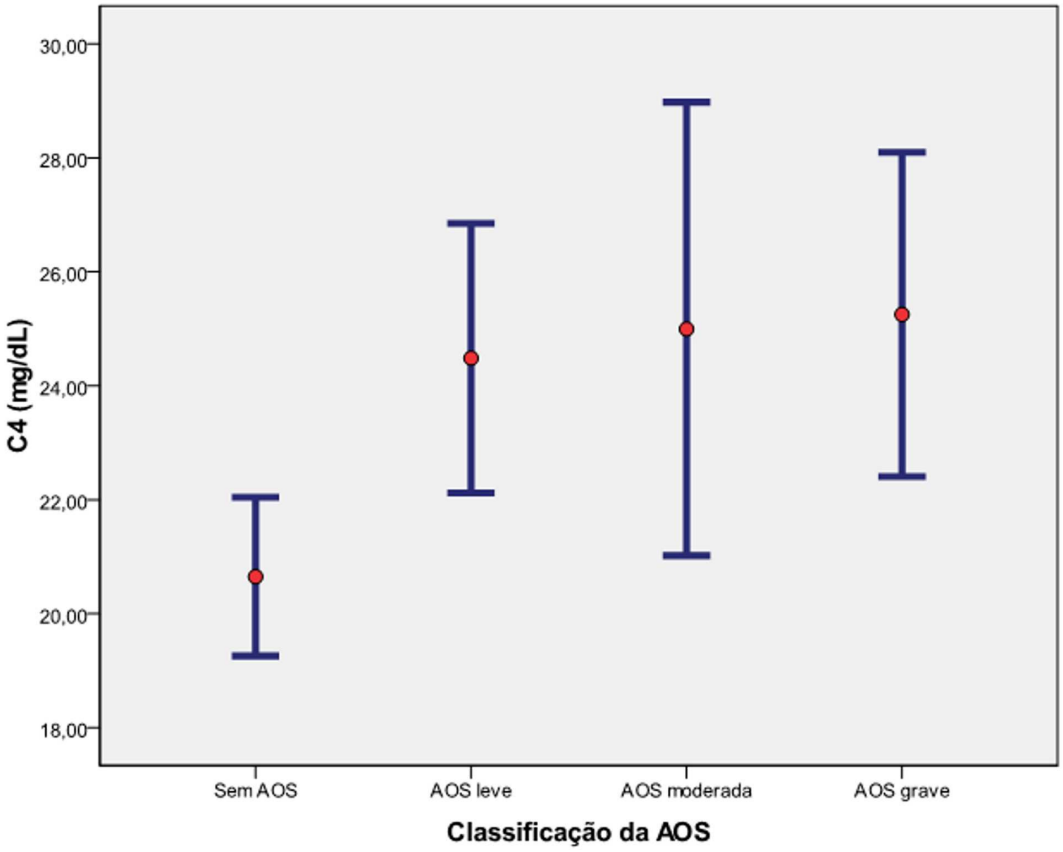

GRÁFICO 8. C4 de acordo com a classificação da apneia - Intervalos de confiança de 95% para as médias.
AOS= apneia obstrutiva do sono.

8.4 Análise dos polimorfismos genéticos

8.4.1 Polimorfismos genéticos nos hipertensos resistentes e não resistentes

Os pacientes com HAR apresentaram diferenças nas prevalências de polimorfismos dos genes *AGTR1*: A1166C (rs5186), *CYP17A1*: rs11191548, *CYP1A2* rs1378942 e *c10orf107*: rs1530440, com predomínio dos alelos selvagens nos pacientes HAR (Tabela 15).

Tabela 15. Frequência (%) dos genótipos nos pacientes hipertensos resistentes e não resistentes.

Genes	Genótipos	TOTAL n = 205	Não-HAR n = 100	HAR n = 105	p-valor
ACE (ID)	D/D	36,3	38,4	34,3	0,830
	I/D	47,3	45,5	49,0	
	I/I	16,4	16,2	16,7	
AGT Met235Thr (rs699)	C/C	37,8	33,3	42,2	0,398
	C/T	45,3	47,5	43,1	
	T/T	16,9	19,2	14,7	
AGTR1 A1166C (rs5186)	A/A	59,7	48,5	70,6	0,005
	A/C	34,8	43,4	26,5	
	C/C	5,5	8,1	2,9	
CYP11B2 C-344T (rs1799998)	T/T	36,3	36,4	36,3	0,108
	C/T	46,8	41,4	52,0	
	C/C	16,9	22,2	11,8	
ADD1 Gly460Trp	G/G	70,1	63,6	76,5	0,092
	G/T	25,9	30,3	21,6	
	T/T	4,0	6,1	2,0	
CYP17A1 rs11191548	T/T	83,6	76,8	90,2	0,037
	C/T	14,9	21,2	8,8	
	C/C	1,5	2,0	1,0	
CYP1A2 rs1378942	G/G	36,3	29,3	43,1	0,017
	G/T	47,3	47,5	47,1	
	T/T	16,4	23,2	9,8	
NPPA T2238C	G/G	6,5	6,1	6,9	0,855
	G/A	31,8	30,3	33,3	
	A/A	61,7	63,6	59,8	
FGF5 rs16998073	A/A	63,7	56,6	70,6	0,118
	A/T	33,8	40,4	27,5	
	T/T	2,5	3,0	2,0	
MTHFR rs17367504	G/G	1,0	1,0	1,0	0,906
	A/G	18,4	17,2	19,6	
	A/A	80,6	81,8	79,4	
c10orf107 rs1530440	C/C	75,1	68,7	81,4	0,037
	C/T	21,9	29,3	14,7	
	T/T	3,0	2,0	3,9	
ZNF rs16948048	A/A	42,8	42,4	43,1	0,983
	A/G	41,8	42,4	41,2	
	G/G	15,4	15,2	15,7	
PLCD3 rs12946454	A/A	68,2	68,7	67,6	0,888
	A/T	27,4	26,3	28,4	
	T/T	4,5	5,1	3,9	

Não-HAR= grupo não resistente; HAR= grupo com hipertensão arterial resistente; ACE= angiotensin I converting enzyme; AGT= angiotensinogen; AGTR1= angiotensin II receptor, type 1; CYP11B2= cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2; ADD1= adducin 1 (alpha); CYP17A1= cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1; CYP1A2= cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2; NPPA= natriuretic peptide A; FGF5= fibroblast growth factor 5; MTHFR= methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H); c10orf107= chromosome 10 open reading frame 107; ZNF652= zinc finger protein 652; PLCD3= phospholipase C, delta 3.

8.4.2 Polimorfismos genéticos de acordo com a classificação da apneia

Quando os pacientes hipertensos foram analisados ,considerando-se a classificação da AOS, o único polimorfismo que apresentou diferença de prevalência foi o ACE entre os grupos sem AOS e AOS moderada (p= 0,018) e também entre AOS leve e AOS moderada (p= 0,024) (Tabela 16).

Tabela 16. Frequência (%) dos genótipos de acordo com a classificação da apneia obstrutiva do sono.

Gene	Genótipos	Sem AOS n = 91	AOS leve n = 50	AOS mod n = 30	AOS grave n = 34
	D/D	41,6	44,9	10,0	33,3
ACE	I/D	46,1	40,8	60,0	48,5
	I/I	12,4	14,3	30,0	18,2

AOS= apneia obstrutiva do sono; mod = moderada; ACE= *angiotensin I converting enzyme*.

8.5 Avaliação da expressão de mRNA e a presença de hipertensão arterial resistente

A comparação entre os grupos de acordo com a presença de resistência à terapia anti-hipertensiva não mostrou diferença significante em relação à expressão do mRNA dos genes *ACE, HIF-1* e *VEGF*. Em relação à classificação da apneia, também não foi observada diferença entre os grupos e a expressão gênica.

Discussão

9.1 A hipertensão arterial resistente

Nos 205 pacientes hipertensos analisados foram observadas características que concordam com o conhecimento atual sobre o paciente hipertenso resistente, ou seja, esses indivíduos apresentaram maior número de comorbidades associadas, como DM e dislipidemia, antecedente pessoal de evento cerebrovascular, e antecedente familiar de DAC quando comparados a indivíduos não resistentes[8,10,11,28,101]. O predomínio do sexo feminino e a maior proporção de raça não branca (pardos e negros) no grupo HAR encontrados neste estudo também estiveram associados à resistência à terapia anti-hipertensiva em diversos trabalhos, como nos dados do *National Health and Nutrition Examination Surveys* em que foram analisados mais de 13.000 pacientes desde 1988 até 2008[12,102].

O encontro de menor proporção de etilistas entre os pacientes com HAR, quando comparados ao não-HAR, diverge da literatura[101] e pode ser explicado pelas orientações para mudanças no estilo de vida mais veementes neste grupo já em seguimento ambulatorial no IDPC, em média há 3 anos, na época de inclusão no estudo. Além disso, é possível que tenha ocorrido maior conscientização tanto do médico como da equipe multiprofissional e, talvez, do próprio paciente quanto ao seu maior risco

cardiovascular, como também da necessidade de ações mais sólidas para diminuir tal risco.

Apesar do maior número de fármacos anti-hipertensivos em uso no grupo HAR, as pressões se mostraram mais elevadas em comparação aos indivíduos não-HAR. Adicionou-se, então, ao pior risco cardiovascular conhecido na população HAR[8], o encontro de menor descenso do sono da PAS quando comparada ao grupo de não-HAR. Deve-se ressaltar, entretanto, que na média, o descenso da PAS foi atenuado para ambos os grupos, adicionando maior risco cardiovascular à população analisada[103].

Os menores valores de colesterol total e LDL-colesterol no grupo HAR provavelmente ocorreram pelo maior uso de ezetimiba nestes indivíduos, já que a literatura sugere o inverso, ou seja, a presença de maiores níveis de colesterol, possivelmente associado à obesidade comumente encontrada nesta população[104]. Apesar da maior porcentagem de uso de insulina e metformina, encontrou-se no grupo HAR maiores valores de HbA1c; entretanto, a diferença não se manteve significativa entre os não diabéticos quando foi considerado o diagnóstico prévio de DM.

Em relação aos marcadores inflamatórios, os pacientes do grupo HAR comparados aos não-HAR apresentaram maior valor de PCR-us, porém, após ajuste por sexo, idade, IMC, DM e dislipidemia, esta diferença passou a ser não significante. Deve-se notar, todavia, que o PCR-us se manteve com valores dentro da normalidade na população estudada. A literatura descreve a associação de hipertensão com inflamação e doença cardiovascular em diversos trabalhos, envolvendo classicamente marcadores como o

PCR-us[35,36,43], inclusive na população com HAR[44], mas, em relação ao complemento, tanto C3 quanto C4, conforme encontrado na população analisada, há poucos dados disponíveis[48].

Outro fato marcante para o grupo HAR foi o encontro de menores taxas de hemoglobina e hematócrito, assim como maiores valores de saturação da transferrina. As características hematológicas encontradas poderiam sugerir, apesar dos valores de hemoglobina e hematócrito ainda dentro dos limites da normalidade, anemia do doente crônico, ou como alguns autores denominam, anemia da inflamação crônica[105]. Entretanto, o achado de saturação da transferrina aumentada é discordante desta hipótese[106]. Ainda divergindo do presente achado, em trabalho que avaliou 101.377 holandeses saudáveis doadores de sangue observou-se correlação positiva entre PA e taxas de hemoglobina[107].

Apesar do aumento da aldosterona, mesmo em níveis considerados fisiológicos, ser associado ao maior risco de desenvolvimento de hipertensão[108,109] e à HAR[110], na população do presente estudo a observação desta elevação no grupo HAR comparada ao não-HAR pode ser também atribuída pela maior prevalência de indivíduos em uso de espironolactona no primeiro grupo.

Em relação à eficiência do sono, na população HAR encontraram-se menores valores em comparação aos não-HAR, sendo que ambos os grupos estiveram abaixo dos limites da normalidade (> 85%)[100]. Além disso, no grupo não-HAR encontrou-se maior tempo de latência para o sono REM, já em níveis acima do considerado normal (entre 70 e 120 minutos)[100],

quando comparado ao grupo não-HAR. Estes achados podem estar associados ao estado de maior atividade simpática encontrada nos pacientes hipertensos[111], o que também contribuiria para o aumento da aldosterona anteriormente relatado no grupo HAR.

O menor índice de PLM no grupo HAR parece ter sido um achado sem importância, uma vez que ele só é considerado patológico se maior que 5 eventos/h[112]. Ademais, não houve diferença entre HAR e não-HAR quando considerado este ponto de corte (9% dos não-HAR tinham índice PLM maior que 5 eventos/h versus 11% do grupo HAR, p= 0,567).

9.2 A apneia obstrutiva do sono

Na população hipertensa analisada, houve predomínio de pacientes sem apneia (44%), seguidos daqueles com AOS leve (24%), moderada (15%) e grave (17%), sendo que não se encontrou diferença significante na prevalência de AOS nos indivíduos de acordo com a presença de HAR, independente de sua gravidade. Esta relativa semelhança entre os grupos pode ser explicada pelo fato dos pacientes terem sido recrutados em ambulatórios de alta complexidade, sendo que os não-HAR também apresentaram prevalência significativa de comorbidades associadas, como DM (28%), dislipidemia (82%) e obesidade (55%), sendo, esta última, com mesmo percentual entre os grupos não-HAR e HAR.

Difícil, entretanto, entender porque a prevalência de AOS nesta amostra (31% para IAH maior que 15 eventos/hora) diferiu da

literatura[13,14,16,21,22], mostrando menor proporção de AOS nos indivíduos HAR (34%) do que observado em análises prévias[16,23]. É provável que, conforme já demonstrado, a classificação dos eventos respiratórios na polissonografia de acordo com a recomendação do manual da *American Academy of Sleep Medicine* de 2007 possa ter contribuído para subestimar o IAH no presente estudo[113].

Concordando com a literatura, a elevação do IAH mostrou-se claramente associada à obesidade[22,30,114,115] (IMC, circunferências cervical, abdominal e de quadril). Em relação ao sexo, também de encontro aos estudos prévios, pacientes com AOS grave apresentaram maior proporção de homens quando comparado aos outros três grupos de apneia[19,22,23].

O curioso achado de pacientes com AOS relatarem fazer mais atividade física do que aqueles sem AOS pode ter ocorrido já que devido ao encontro de maior IMC, possivelmente, assim como para o etilismo nos pacientes com HAR, houve orientações de forma mais intensiva quanto à mudança de estilo de vida.

9.2.1 A apneia obstrutiva do sono e seus efeitos na pressão arterial, metabolismos glicídico e lipídico, e atividade inflamatória

O encontro de menores valores de PAD nas 24 horas, vigília e sono pela MAPA no grupo com AOS, independente da gravidade, comparado aos sem AOS foi achado intrigante e resultou em análises multivariadas com

diversos modelos. Concluiu-se, assim, que a presença da AOS se relacionou à menor PAD apenas nas mulheres e em pacientes com HAR, ou seja, pode-se depreender que nos demais subgrupos analisados (Tabela 11) não houve associação da AOS com a PA. Estes resultados discordam da ampla maioria dos estudos que descrevem classicamente correlação positiva entre PA e AOS[49-52]. Mais uma vez, poderia se atribuir ao tratamento “intensivo” no grupo HAR o encontro de menores níveis de PAD. Quanto ao gênero, o sexo feminino não se mostra preditor de adesão à terapêutica anti-hipertensiva e, assim, a explicação anteriormente citada não poderia ser aplicada[116,117]. Outros fatores como a idade foram analisados, entretanto não se mostraram diferentes entre os sexos.

Quanto ao descenso da PA no sono, interessante observar que, em relação à PAS, não houve diferença entre os grupos de acordo com a AOS. Já para a PAD, os pacientes com AOS grave apresentaram menor descenso quando comparados aos com apneia moderada, e estes, por sua vez, maior descenso quando contrapostos aos grupos sem apneia e com apneia leve. Vale ressaltar que o descenso do sono para a PAD esteve dentro dos valores da normalidade (≥ 10% e ≤ 20%),118 em todos os grupos, de acordo com a AOS, o que não ocorreu para o da PAS que apresentou atenuado (> 0 e < 10%)[118]. Classicamente, a AOS tem sido associada a descenso da PA no sono diminuído ou ausente[24,119], resultante da atividade simpática aumentada durante o sono, independente da presença de hipertensão diurna, conforme observado entre AOS grave e moderada no presente estudo; entretanto, dados mais recentes discordam deste paradigma[23] e

sugerem, ainda, que o tempo entre as medidas da PA pela MAPA deveria ser menor em pacientes com AOS[120].

Apesar de vários estudos demonstrarem a associação entre a AOS e a resistência insulínica[121-124], na presente análise, após correção para sexo, IMC e HAR, a diferença do HOMA IR entre os pacientes, de acordo com a classificação da AOS, não se manteve. Ressalta-se que a maioria dos indivíduos na população analisada era obesa, o que pode ter interferido na tentativa de se mostrarem as diferenças entre os grupos.

Importante notar que marcadores inflamatórios, como o C3 e o C4, apresentaram, respectivamente, maiores médias em pacientes com AOS grave e também nos indivíduos com AOS (independente da gravidade) mesmo após controle por sexo, IMC e HAR. Todavia, após ajuste para DM e dislipidemia, permaneceram as diferenças significantes para o C4, mas não ao C3. Tanto para o C3 como para o C4, as taxas se mantiveram dentro dos limites da normalidade para o padrão das análises laboratoriais do IDPC, entre 88 a 201 mg/dL e 13 a 45 mg/dL, respectivamente. A constatação do aumento do complemento já foi descrita associada ao desenvolvimento de hipertensão[45], e relacionada à população HAR[46], entretanto, tanto para a população hipertensa[47] quanto para a com AOS os trabalhos são escassos.

9.3 Genética

No grupo HAR houve predomínio dos alelos selvagens, ou seja, maior prevalência de A/A no *AGTR1*, T/T na *CYP17A1*, G/G na *CYP1A2* e C/C no *c10orf107* quando comparados aos não-HAR.

Em relação aos polimorfismos *ACE, AGT* e *AGTR1*, os resultados da literatura são conflitantes ao tentar relacioná-los à hipertensão. Conen et al.[71,75], ao avaliarem estes polimorfismos, não verificaram nenhuma evidência de associação consistente com hipertensão em mulheres caucasianas. O *Framingham Heart Study* observou ligações significativas entre o genótipo do *ACE* I/D, com a PA entre os homens, mas não entre as mulheres76. Entretanto, outros estudos mostraram que os mesmos polimorfismos apresentam associação com a hipertensão[74,77,78] em ambos os gêneros.

A predominância do alelo T/T do gene *CYP17A1* rs11191548 nos pacientes do grupo HAR, comparado aos demais alelos, concorda com análises do *genome-wide association studies* (GWAS)[66,67] que associou este alelo à maior PA. É importante notar que outros SNPs deste mesmo gene foram avaliados em outros estudos e que resultados controversos podem estar associados a estas variações nos SNPs estudados[65-67].

Resultados conflitantes foram descritos relacionando a PA aos polimorfismos da *CYP1A2* rs1378942, gene associado com o metabolismo de vários fármacos[57,65,67], sendo que a presente análise discorda de grande análise do GWA que identificou correlação entre o alelo C/C e PAD[57,65,67].

Para o polimorfismo do *c10orf107* rs1530440, a GWA[67] evidenciou que o alelo T se associou com menores valores de PAD; entretanto, a presente análise mostrou associação do T/T com HAR.

Na população analisada, de acordo com a classificação da AOS, o único polimorfismo que apresentou diferença significante de prevalência foi o *ACE* com predomínio do alelo ID nos pacientes com AOS moderada, colaborando com os resultados conflitantes que analisam a associação *ACE* à AOS[125-130]. Assim como a hipertensão, a AOS é possivelmente doença poligênica e certamente multifatorial[111], dificultando a associação de um único gene com a sua presença ou gravidade.

Em resumo, mesmo grandes estudos até o momento não foram concordantes em imputar a determinados polimorfismos genéticos associação clara com a hipertensão. É possível atribuir esta dificuldade às características próprias da hipertensão, ou seja, vários genes envolvidos, a interferência do meio ambiente (alimentação, atividade física, estresse) e de outras determinantes, como a concomitância de obesidade, dislipidemia, DM[111]. Além disso, a epigenética, ação ambiental que promove eventos moleculares específicos relacionados à expressão gênica e prevê mecanismos subjacentes para muitos eventos de *imprinting* ou programação[131], tem sinalizado que alterações na metilação do DNA e modificações na histona podem também se associar a características individuais dos pacientes[57].

Conclusão

Na população analisada, a prevalência de AOS entre pacientes hipertensos foi significativa, particularmente entre obesos e do sexo masculino.

A presença de AOS associou-se somente no sexo feminino e em pacientes com HAR a menores valores de PAD, quando comparados aos pacientes sem AOS.

Pacientes com AOS grave apresentaram menor descenso do sono da PAD, porém em todos os grupos este foi atenuado.

A inflamação sistêmica também se mostrou associada à AOS, imputando fator de risco adicional a estes pacientes.

Os pacientes do grupo HAR comparados aos não-HAR apresentaram maior prevalência de fatores de risco cardiovascular clássicos como DM, dislipidemia, doença cerebrovascular, antecedente familiar de DAC, elevação da PA e descenso do sono atenuado.

No grupo HAR encontrou-se menor eficiência do sono e aumento da latência para o sono REM.

Estudos maiores que avaliem não somente o DNA e a expressão de mRNA mas suas funcionalidades são necessários para melhor definir o papel da genética na hipertensão e AOS.

Anexos

ANEXO A Termo de consentimento livre e esclarecido

TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação da influência da apneia obstrutiva do sono sobre a pressão, metabolismo glicídico, lipídico e inflamatório em pacientes hipertensos resistentes

CENTRO: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Investigadora: Dra Carolina Gonzaga

N° DO PACIENTE: _____ INICIAIS DO PACIENTE: _____

OBJETIVO DESTE ESTUDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar deste estudo para avaliar o efeito das alterações do sono, glicose "(açúcar do sangue"), colesterol ("gordura do sangue") sobre a PA de difícil controle, e sobre outras doenças cardíacas, informações que ainda não estão bem estabelecidas atualmente. O objetivo deste estudo é também avaliar os fatores genéticos da hipertensão resistente ao tratamento e o possível envolvimento com a síndrome da apneia obstrutiva do sono (doença em que o indivíduo faz pausas na respiração enquanto dorme) e o perfil de inflamação.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Após ler todo o presente termo de consentimento, e tirar dúvidas, o(a) senhor(a) caso queira participar deste estudo assinará o termo em duas vias, e levará uma cópia para casa. A duração total do estudo será de aproximadamente 1 mês.

Na Visita 0, durante a consulta médica, será feita anamnese (história clínica), exame físico, e medida da PA. Serão checados os critérios de inclusão e exclusão dos participantes. Na Visita 1 será realizada a polissonografia. No dia seguinte pela manhã ou até 15 dias depois (Visita 2), serão feitas a análise da PA central de forma não invasiva e instalação da medida ambulatorial da PA (MAPA), a qual será retirada 24 horas após.

Continua

ANEXO A *continuação*

Na análise da pressão central, será utilizado um pequeno transdutor, um pouco maior e semelhante a uma caneta, que será colocado sobre o trajeto de suas artérias carótida (no pescoço), femural (na virilha) e radial (no punho). O método é não-invasivo, indolor, e a duração total em torno de 30 minutos. Para a polissonografia, será necessário que o(a) senhor(a) passe uma noite no hospital, quando seu sono será monitorado por uma equipe especializada que verificará parâmetros respiratórios através de oximetria de pulso, cinta abdominal e torácica, e cateter de fluxo nasal, além de eletroencefalograma, e eletrodos para detectar movimentos oculares, de músculos da face e das pernas. Antes e após o teste será colhido aproximadamente 40 mL do seu sangue. As amostras serão utilizadas para medir glicose, colesterol e outros lipídeos, hormônios da tireóide e também para realizar os testes genéticos, relacionados à hipertensão, dislipidemia e inflamação.

Um pouco do sangue coletado durante o estudo será, caso o(a) senhor(a) concorde, conservado e guardado no Laboratório de Biologia Molecular, por no máximo 5 anos, sendo utilizado para analisar genes relacionados à hipertensão, dislipidemia e inflamação. O(a) senhor(a) concorda que seu sangue seja guardado?

Sim, eu concordo ( ) Não, eu não concordo ( ) – mesmo que o(a) senhor(a) não concorde que parte do seu sangue seja armazenado, o(a) senhor(a) poderá participar do estudo.

Na Visita 3, programada para até 1 mês após a polissonografia, serão entregues os resultados dos exames e serão fornecidas orientações médicas quanto aos seus diagnósticos e tratamentos.

RISCOS E DESCONFORTOS

Os riscos ou desconfortos envolvidos são: punção venosa para coleta de sangue podendo causar dor, hematoma (acúmulo de sangue embaixo da pele) ou raramente infecção na pele; durante a MAPA poderá ocorrer desconforto pelas medidas da PA; e durante o estudo do sono, poderá haver desconforto pelo posicionamento das cintas abdominais e torácicas.

continua

ANEXO A *continuação*

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

O benefício do estudo poderá ser o melhor entendimento dos mecanismos que controlam sua PA, e, além disso, as informações coletadas durante o estudo poderão beneficiar pacientes futuros com risco ou diagnóstico de hipertensão.

ALTERNATIVAS À PARTICIPAÇÃO

Caso o(a) senhor(a) não queira participar deste estudo, receberá atendimento rotineiro no IDPC não implicando em prejuízo do seu tratamento.

CONFIDENCIALIDADE

Se o(a) senhor(a) aceitar participar deste estudo, todos os seus registros médicos serão verificados pela equipe de pesquisa em busca de dados para o estudo. Assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido o(a) senhor(a) está dando permissão para que isso seja feito. Sua identidade será mantida em segredo quando os resultados do estudo forem publicados, pois, o(a) senhor(a) está autorizando o seu dados a serem publicados em revistas, artigos e serem tema de debates e aulas. As informações coletadas durante o estudo serão armazenadas em um computador, mas seu nome não. Seu médico será informado de sua participação neste estudo

NOVOS ACHADOS

Você será informado sobre quaisquer novos achados importantes que se tornarem disponíveis durante o estudo que possam influenciar seu desejo de continuar ou não a participar do estudo.

continua

ANEXO A *continuação*

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E CONSENTIMENTO

Sua participação neste estudo é voluntária. O(a) senhor(a) pode se recusar a participar ou pode desistir, a qualquer momento durante o estudo, sem ter que dar explicações. Isso não mudará a qualidade de atendimento que você estará recebendo muito menos em qualquer tipo de penalidade.

Os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no programa de pesquisa após análise das razões pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição. O motivo será explicado a você e pode ser devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outras complicações se continuar a participar, cancelamento do estudo pela coordenação do estudo, por você não cumprir as orientações dadas pela equipe de pesquisa ou outras questões administrativas. Caso isso venha a acontecer seu tratamento continuará sendo feito pelo seu médico.

TRATAMENTO MÉDICO/INDENIZAÇÃO

Os custos de seu tratamento regular durante o estudo não serão arcados pela patrocinadora ou pelo Centro de Pesquisa. Os danos relacionados a este estudo clínico são quase os mesmos de um tratamento comum, visto que os exames realizados são semelhantes ao da rotina dos pacientes hipertensos resistentes do IDPC.

Em caso de dúvida a respeito de danos relacionados à pesquisa ou caso o(a) senhor(a) apresente uma reação adversa (efeito colateral) durante o estudo entre em contato imediatamente com Dra. Carolina Gonzaga no telefone 5085-6144 ou com a Dra Adriana Bertolami, telefone 5085-6047. O serviço de pronto-socorro do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia estará pronto a recebê-lo e tratá-lo em caso de intercorrências, também entrando em contato com o médico responsável pelo estudo caso necessário.

Ao assinar este termo você não abre mão de nenhum direito legal.

continua

ANEXO A *continuação*

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

As investigadoras clínicas, Dra. Carolina Gonzaga, tel 5085-6144, e Dra Adriana Bertolami, tel 5085-6047, irão responder todas as dúvidas que o(a) senhor(a) possa ter sobre sua participação neste estudo. Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o(a) senhor(a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no tel 5085-6040. Uma cópia deste termo será entregue para você.

Li e compreendi este termo de consentimento e todas as minhas dúvidas foram resolvidas. Recebi explicações sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos de estudo a que serei submetido e os possíveis riscos e desconfortos e os benefícios que posso apresentar. As alternativas à minha participação neste estudo também foram discutidas. Portanto, concordo voluntariamente em fornecer meu consentimento para participar deste estudo clínico.

Nome do voluntário	Assinatura do voluntário	Data
Testemunha (se necessário)	Assinatura da testemunha	Data

Nome da pessoa que conduziu discussão do consentimento/Assinatura/Data

ANEXO B Questionário de Berlim

Questionário de Berlim

Categoria 1

1. Você ronca? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

2. Seu ronco é:

( ) Pouco mais alto que respirando

( ) Tão alto quanto falando

( ) Mais alto que falando

( ) Muito alto que pode ser ouvido nos quartos próximos

2. Com que frequência você ronca?

( ) Praticamente todos os dias

( ) 3-4x por semana

( ) 1-2x por semana ou por mês

( ) nunca ou praticamente nunca

3. O seu ronco alguma vez incomodou alguém? ( )Sim ( ) Não

4. Alguém notou que você para de respirar enquanto dorme?

( ) Praticamente todos os dias

( ) 3-4x por semana

( ) 1-2x por semana ou por mês

( ) Nunca ou praticamente nunca

Categoria 2

5. Quantas vezes você se sente cansado ou com fadiga depois de acordar?

( ) Praticamente todos os dias

( ) 3-4x por semana

( ) 1-2x por semana ou por mês

( ) Nunca ou praticamente nunca

6. Quando você está acordado, você se sente cansado, fadigado ou não se sente bem?

( ) Praticamente todos os dias

( ) 3-4x por semana

( ) 1-2 x por semana ou por mês

( ) Nunca ou praticamente nunca

continua

ANEXO B *continuação*

7. Alguma vez você cochilou ou caiu no sono ao dirigir? ( )Sim ( )Não

Se sim, quantas vezes isto ocorreu?

( ) Praticamente todos os dias

( ) 3-4x por semana

( ) 1-2x por semana ou por mês

( ) Nunca ou praticamente nunca

Categoria 3

8. Você tem pressão alta? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

9. IMC > 30 kg/m2? ( ) Sim ( ) Não

ANEXO C Escala de Sonolência Epworth

Com que frequência o (a) senhor (a) cochila ou adormece? Use a seguinte escala para escolher o número mais apropriado para cada situação: 0 = Nunca cochilo / 1 = Mínima chance de cochilar / 2 = Moderada chance de cochilar / 3 = Alta chance de cochilar	
Situação	**Escala de "Cochilo"**
Sentar e ler	
Assistir televisão	
Sentar-se inativo em local público (ex: cinema, aula)	
Como passageiro em um carro por 1 hora sem parar	
Deitar para descansar à tarde quando possível	
Sentar e conversar com alguém	
Sentar tranquilamente após o almoço (sem ingestão de bebida alcoólica)	
Em um carro parado por poucos minutos no trânsito	
Total:	

ANEXO D Relação dos oligonucleotídeos sintetizados para a reação de pirosequenciamento

Nome do oligonucleotideo	Sequência
F1 - *AGT* - rs699	5´ - AGGATGGAAGACTGGCTGCTC -3´
R1 - *AGT* - rs699	5 biotina ´- GGGTGCTGTCCACACTGG -3´
S1 - *AGT* - rs699	5´- CTGGCTGCTCCCTGA -3´
F1 - *AGTR1* - rs5186	5´ biotina - TGCAGCACTTCACTACCAAAT
R1 - *AGTR1* - rs5186	5´- TCCTTCAATTCTGAAAAGTAGC
S1 - *AGTR1* - rs5186	5´- CTTCACTACCAAATGAGC
F1 - *CYP11B2* - rs1799998	5´ biotina - AAGTCTATTAAAAGAATCCAAGGC
R1 - *CYP11B2* - rs1799998	5´- TTTATCTTATCGTGAGATGAGAGG
S1 - *CYP11B2* - rs1799998	5´- TCGTGAGATGAGAGGG
F1 - *ADD1* - rs4961	5´ biotina - CGGGGCGACGAAGCTTCC
R1 - *ADD1* - rs4961	5´- CGGGGCGACGAAGCTTCC
S1 - *ADD1* - rs4961	5´- TGCTTCCATTCTGCC
F1 - *CYP17A1* - rs11191548	5´ biotina - GATTAAATAGTTTCCATAACATG
R1 - *CYP17A1* - rs11191548	5´- GTATTAGGGTAGGAACCTTAC
S1 - *CYP17A1* - rs11191548	5´- GTAGGAACCTTACCCAC
F1 - *CYP1A2* - rs1378942	5´ ACTGCCTGCTGAAGAAATAGTGG-3´
R1 - *CYP1A2* - rs1378942	5 biotina- ´- GGCAGAAATTGTCCCAGACAC-3´
S1 - C*YP1A2* - rs1378942	5´- AGAAAATGAGTACATTCATG-3´
F1 - *NPPA* - rs5065	5´ biotina - CTTGTCCTCCCTGGCTGTTAT
R1 - *NPPA* - rs5065	5´- ATGTCTGTGTTCTCTTTGCAGTA
S1 - *NPPA* - rs5065	5´- TGTGTTCTCTTTGCAGTAC
F1 - *FGF5* - rs16998073	5´ biotina - CTGGCCTCAGTTTAAACCC
R1 - *FGF5* - rs16998073	5´- GAGACCGTCTCAATATTTACAACA
S1 - *FGF5* - rs16998073	5´- CGTCTCAATATTTACAACAT
F1 - *MTHFR* - rs17367504	5´- biotina ACTGTGGAGGGACTTTTACAGG -3´
R1 - *MTHFR* - rs17367504	5´ - GGTCATCTGATCTGCAACTTCT3´
S1 - *MTHFR* - rs17367504	5´- TCTGATCTGCAACTTCTC3´
F1 - *c10orf107* - rs1530440	5´ biotina GGAGCTTGATCCCAAGGTTTA -3´
R1 - *c10orf107* - rs1530440	5´ - GTCCATGCTGCCTTATCTGAT -3´
S1 - *c10orf107* - rs1530440	5´- GATTTGATATTTCTGGAAAG -3´
F1 - *ZNF652* - rs16948048	5´- GCATTTATCCGAGTTCAGAGACAA -3´
R1 - *ZNF652* - rs16948048	5´biotina- ATTTCCTCTCCCTGTACCCTAAAC-3´
S1 - *ZNF652* - rs16948048	5´- GAGACAAGAGAGTGTCCAT3´
F1- *PLCD3* - rs12946454	5´ - CACTCTCCACACTCACTCCTGC-3´
R1- *PLCD3* - rs12946454	5 biotina ´- GGCATCAGGAGCCCCAGA-3´
S1- *PLCD3* - rs12946454	5´- ACTCACTCCTGCCCA-3´

F= *forward*; R= *reverse*; S= *sequencing*, *ACE= angiotensin I converting enzyme; AGT= angiotensinogen; AGTR1= angiotensin II receptor, type 1; CYP11B2= cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2; ADD1= adducin 1 (alpha); CYP17A1= cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1; CYP1A2= cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2; NPPA= natriuretic peptide A; FGF5= fibroblast growth factor 5; MTHFR= methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H); c10orf107= chromosome 10 open reading frame 107; ZNF652= zinc finger protein 652; PLCD3= phospholipase C, delta 3*

ANEXO E Avaliação do sono dos pacientes hipertensos de acordo com a classificação da apneia

	Sem AOS n = 91	**AOS leve n = 50**	**AOS mod n = 30**	**AOS grave n = 34**
Epworth	9,9 ± 5,7	10,0 ± 5,9	9,6 ± 6,2	12,1 ± 5,2
IAH, eventos/h*	1,9 ± 1,6	9,8 ± 2,8	22,9 ± 4,4	62,0 ± 25,0
SpO_2 basal, %†	97,0 (96,0-98,0)	96,0 (95,0-97,0)	96,0 (95,0-97,0)	95,0 (94,0-97,0)
SpO_2 média, %†	95,0 (94,0-97,0)	94,0 (93,0-95,0) [a]	94,0 (93,0-95,0) [a]	92,0 (89,0-94,0) [a,b,c]
SpO_2 mínima, %†	89,0 (86,0-93,0)	84,0 (79,0-86,0) [a]	79,0 (69,0-85,0) [a,b]	72,0 (55,0-79,0) [a,b,c]
Tempo SpO_2 < 90%, min*	0,5 ± 1,0	0,5 ± 0,9 [a]	0,7 ± 1,0 [a]	1,6 ± 0,7[a,b,c]
Latência do sono, min*	15,6 ± 18,3	19,3 ± 18,4	14,9 ± 13,9	16,5 ± 13,7
Eficiência do Sono, %†	79,7 (73,5-84,7)	79,1 (67,3-86,1)	80,8 (66,1-87,4)	77,7 (63,0-84,2)
Índice de despertar, %*	17,1 ± 9,5	19,5 ± 12,5	20,7 ± 15,0	41,5 ± 23,6 [a,b,c]
Tempo acordado, min†	63,0 (43,0-83,0)	63,0 (39,0-99,0)	59,0 (38,0-104,0)	71,0 (35,0-117,0)
Estágio N1, %*	12,8 ± 6,7	15,5 ± 9,7	15,2 ± 8,6	25,1 ± 17,2 [a,b,c]
Estágio N2, %†	51,6 (44,6-59,6)	47,3 (39,9-57,4)	51,7 (38,5-58,1)	51,9 (40,7-57,7)
Estágio N3, %†	18,5 (14,1-22,9)	19,0 (11,6-27,9)	18,7 (12,7-25,8)	12,5 (6,0-18,4) [a,b,c]
Sono REM, %†	15,7 (10,7-20,9)	16,0 (11,5-20,2)	15,8 (11,0-21,1)	12,7 (9,4-18,6)
Latência do REM, min†	119,0 (71,0-185,0)	99,0 (74,0-166,0)	118,0 (91,0-191,0)	136,0 (68,0-200,0)
Índice PLM, eventos/h*	1,3 ± 2,7	3,6 ± 8,5	1,3 ± 1,8	5,3 ± 17,9
Índice PLM associados a despertar, eventos/h*	0,6 ± 0,9	1,4 ± 2,8	0,9 ± 1,3	3,1 ± 7,5

AOS = apneia obstrutiva do sono; mod = moderada; IAH = índice de apneia e hipopneia; SpO_2 = saturação da oxi-hemoglobina; REM = *Rapid Eye Movement;* PLM = movimento periódico dos membros.

* mediana (p25-p75); † média ± desvio padrão.

[a] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo sem AOS; [b] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com AOS leve; [c] $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com AOS moderada

Referências Bibliográficas

1 VI Brazilian Guidelines on Hypertension. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95:1-51.

2 Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK, He J. Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *J Hypertens* 2004;22:11-9.

3 Cipullo JP, Martin JF, Ciorlia LA, Godoy MR, Cacao JC, Loureiro AA, et al. Hypertension prevalence and risk factors in a Brazilian urban population. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94:519-26.

4 Rosario TM, Scala LC, Franca GV, Pereira MR, Jardim PC. Prevalence, control and treatment of arterial hypertension in Nobres - MT. *Arq Bras Cardiol*. 2010;93:622-8, 72-8.

5 McAlister FA, Wilkins K, Joffres M, Leenen FH, Fodor G, Gee M, et al. Changes in the rates of awareness, treatment and control of hypertension in Canada over the past two decades. *CMAJ*. 2011;183:1007-13.

6 Egan BM, Zhao Y, Axon RN. US trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988-2008. *JAMA*. 2010;303:2043-50.

7 Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK, He J. Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *J Hypertens*. 2004;22:11-9.

8 Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, 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-e26.

9 Alessi A, Brandao AA, Coca A, Cordeiro AC, Nogueira AR, Diogenes de Magalhaes F, et al. First Brazilian position on resistant hypertension. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99:576-85.

10 de la Sierra A, Segura J, Banegas JR, Gorostidi M, de la Cruz JJ, Armario P, et al. Clinical features of 8295 patients with resistant hypertension classified on the basis of ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertension*. 2011;57:898-902.

11 Daugherty SL, Powers JD, Magid DJ, Tavel HM, Masoudi FA, Margolis KL, et al. Incidence and prognosis of resistant hypertension in hypertensive patients. *Circulation*. 2012;125:1635-42.

12 Egan BM, Zhao Y, Axon RN, Brzezinski WA, Ferdinand KC. Uncontrolled and apparent treatment resistant hypertension in the United States, 1988 to 2008. *Circulation*. 2011;124:1046-58.

13 Bouscoulet LT, Vazquez-Garcia JC, Muino A, Marquez M, Lopez MV, de Oca MM, et al. Prevalence of sleep related symptoms in four Latin American cities. *J Clin Sleep Med*. 2008;4:579-85.

14 Jennum P, Riha RL. Epidemiology of sleep apnoea/hypopnoea syndrome and sleep-disordered breathing. *Eur Respir J*. 2009;33:907-14.

15 Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LR. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med*. 2010;11:441-6.

16 Lloberes P, Lozano L, Sampol G, Romero O, Jurado MJ, Rios J, et al. Obstructive sleep apnoea and 24-h blood pressure in patients with resistant hypertension. *J Sleep Res*. 2010;19:597-602.

17 Kapur V, Strohl KP, Redline S, Iber C, O'Connor G, Nieto J. Underdiagnosis of sleep apnea syndrome in U.S. communities. *Sleep Breath*. 2002;6:49-54.

18 Young T, Evans L, Finn L, Palta M. Estimation of the clinically diagnosed proportion of sleep apnea syndrome in middle-aged men and women. *Sleep*. 1997;20:705-6.

19 Myers KA, Mrkobrada M, Simel DL. Does this patient have obstructive sleep apnea?: The Rational Clinical Examination systematic review. *JAMA*. 2013;310:731-41.

20 Goncalves SC, Martinez D, Gus M, de Abreu-Silva EO, Bertoluci C, Dutra I, et al. Obstructive sleep apnea and resistant hypertension: a case-control study. *Chest*. 2007;132:1858-62.

21 Gonzaga CC, Gaddam KK, Ahmed MI, Pimenta E, Thomas SJ, Harding SM, et al. Severity of obstructive sleep apnea is related to aldosterone status in subjects with resistant hypertension. *J Clin Sleep Med*. 2010;6:363-8.

22 Logan AG, Perlikowski SM, Mente A, Tisler A, Tkacova R, Niroumand M, et al. High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. *J Hypertens*. 2001;19:2271-7.

23 Pedrosa RP, Drager LF, Gonzaga CC, Sousa MG, de Paula LK, Amaro AC, et al. Obstructive sleep apnea: the most common secondary cause of hypertension associated with resistant hypertension. *Hypertension*. 2011;58:811-7.

24 Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, et al. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/american College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation*. 2008;118:1080-111.

25 Pépin JL, Borel AL, Baguet JP, Tamisier R, Lévy P, Mallion JM. Hypertension and sleep. *European Society of Hypertension Newsletter: Update on Hypertension Management*. 2010;11:Nº 46.

26 Calhoun DA, Harding SM. Sleep and hypertension. *Chest*. 2010;138:434-43.

27 Friedman O, Bradley TD, Chan CT, Parkes R, Logan AG. Relationship between overnight rostral fluid shift and obstructive sleep apnea in drug-resistant hypertension. *Hypertension*. 2010;56:1077-82.

28 Somers VKJ, S. Cardiovascular effects of sleep-related breathing disorders. In: Kryeger MHR, T.; Dement, W. C., ed. *Principles and practice of sleep medicine*. St Louis: Elsevier Saunders; 2011:1370-80.

29 Wolk R, Shamsuzzaman AS, Somers VK. Obesity, sleep apnea, and hypertension. *Hypertension*. 2003;42:1067-74.

30 Drager LF, Genta PR, Pedrosa RP, Nerbass FB, Gonzaga CC, Krieger EM, et al. Characteristics and predictors of obstructive sleep apnea in patients with systemic hypertension. *Am J Cardiol*. 2010;105:1135-9.

31 Cintra FD, Tufik S, Paola A, Feres MC, Melo-Fujita L, Oliveira W, et al. Cardiovascular profile in patients with obstructive sleep apnea. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96:293-9.

32 Drager LF, Polotsky VY, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea: an emerging risk factor for atherosclerosis. *Chest*. 2011;140:534-42.

33 Ip MS, Lam B, Ng MM, Lam WK, Tsang KW, Lam KS. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:670-6.

34 Punjabi NM, Sorkin JD, Katzel LI, Goldberg AP, Schwartz AR, Smith PL. Sleep-disordered breathing and insulin resistance in middle-aged and overweight men. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:677-82.

35 Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2002;347:1557-65.

36 Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, Gaziano JM, Cook NR. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Risk Score for men. *Circulation*. 2008;118:2243-51, 4p following 51.

37 Feig DI, Kang DH, Johnson RJ. Uric acid and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2008;359:1811-21.

38 Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension*. 2003;41:1183-90.

39 Kanellis J, Kang DH. Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease. *Semin Nephrol*. 2005;25:39-42.

40 Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Lanfranchi P, Wolk R, Kara T, Accurso V, et al. Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2002;105:2462-4.

41 Drager LF, Lopes HF, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Toschi-Dias E, Alves MJ, et al. The impact of obstructive sleep apnea on metabolic and inflammatory markers in consecutive patients with metabolic syndrome. *PLoS One*. 2010;5:e12065.

42 Jelic S, Lederer DJ, Adams T, Padeletti M, Colombo PC, Factor PH, et al. Vascular inflammation in obesity and sleep apnea. *Circulation*. 2010;121:1014-21.

43 Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA*. 2003;290:2945-51.

44 Salles GF, Fiszman R, Cardoso CR, Muxfeldt ES. Relation of left ventricular hypertrophy with systemic inflammation and endothelial damage in resistant hypertension. *Hypertension*. 2007;50:723-8.

45 Engstrom G, Hedblad B, Berglund G, Janzon L, Lindgarde F. Plasma levels of complement C3 is associated with development of hypertension: a longitudinal cohort study. *J Hum Hypertens*. 2006;21:276-82.

46 Magen E, Feldman A, Cohen Z, Alon DB, Linov L, Mishal J, et al. Potential link between C3a, C3b and endothelial progenitor cells in resistant hypertension. *Am J Med Sci*. 2010;339:415-9.

47 Nadar SK, Lip GY. New insights into complement C3 and inflammation in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2007;21:261-3.

48 Cymerys M, Bogdanski P, Pupek-Musialik D, Jablecka A, Lacki J, Korczowska I, et al. Influence of hypertension, obesity and nicotine abuse on quantitative and qualitative changes in acute-phase proteins in patients with essential hypertension. *Med Sci Monit*. 2012;18:CR330-6.

49 Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA*. 2000;283:1829-36.

50 Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med*. 2000;342:1378-84.

51 Hla KM, Young TB, Bidwell T, Palta M, Skatrud JB, Dempsey J. Sleep apnea and hypertension. A population-based study. *Ann Intern Med*. 1994;120:382-8.

52 Young T, Peppard P, Palta M, Hla KM, Finn L, Morgan B, et al. Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch Intern Med*. 1997;157:1746-52.

53 Gonzaga CC, Drager LF, Lorenzi-Filho G. Apneia obstrutiva do sono como causa da hipertensão arterial. In: A.A. B, Amodeo C, Nobre F, eds. *Hipertensão*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

54 Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, Gottlieb DJ, Newman AB, O'Connor GT, et al. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med*. 2009;6:e1000132.

55 Arnett DK, Claas SA, Glasser SP. Pharmacogenetics of antihypertensive treatment. *Vascul Pharmacol*. 2005;44:107-18.

56 Lacchini R, Sabha M, Coeli FB, Favero FF, Yugar-Toledo J, Izidoro-Toledo TC, et al. T allele of -344 C/T polymorphism in aldosterone synthase gene is not associated with resistant hypertension. *Hypertens Res*. 2009;32:159-62.

57 Padmanabhan S, Newton-Cheh C, Dominiczak AF. Genetic basis of blood pressure and hypertension. *Trends Genet*. 2012;28:397-408.

58 Yugar-Toledo JC, Martin JF, Krieger JE, Pereira AC, Demacq C, Coelho OR, et al. Gene variation in resistant hypertension: multilocus analysis of the angiotensin 1-converting enzyme, angiotensinogen, and endothelial nitric oxide synthase genes. *DNA Cell Biol*. 2011;30:555-64.

59 Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*. 2000;12:205s-13s.

60 Fung MM, Rao F, Poddar S, Mahata M, Khandrika S, Mahata SK, et al. Early inflammatory and metabolic changes in association with AGTR1 polymorphisms in prehypertensive subjects. *Am J Hypertens*. 2010;24:225-33.

61 Rajan S, Ramu P, Umamaheswaran G, Adithan C. Association of aldosterone synthase (CYP11B2 C-344T) gene polymorphism & susceptibility to essential hypertension in a south Indian Tamil population. *Indian J Med Res*. 2010;132:379-85.

62 Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, et al. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet*. 1997;349:1353-7.

63 Ramu P, Umamaheswaran G, Shewade DG, Swaminathan RP, Balachander J, Adithan C. Gly460Trp polymorphism of the ADD1 gene and essential hypertension in an Indian population: A meta-analysis on hypertension risk. *Indian J Hum Genet*. 2010;16:8-15.

64 Yang SJ, Lee ST, Kim WJ, Park SE, Park SW, Kim JW, et al. Genetic variation in CYP17A1 is associated with arterial stiffness in diabetic subjects. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:827172.

65 Xi B, Shen Y, Reilly KH, Wang X, Mi J. Recapitulation of four hypertension susceptibility genes (CSK, CYP17A1, MTHFR, and FGF5) in East Asians. *Metabolism*. 2013;62:196-203.

66 Ganesh SK, Tragante V, Guo W, Guo Y, Lanktree MB, Smith EN, et al. Loci influencing blood pressure identified using a cardiovascular gene-centric array. *Hum Mol Genet*. 2013;22:1663-78.

67 Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet*. 2009;41:666-76.

68 Lynch AI, Boerwinkle E, Davis BR, Ford CE, Eckfeldt JH, Leiendecker-Foster C, et al. Pharmacogenetic association of the NPPA T2238C genetic variant with cardiovascular disease outcomes in patients with hypertension. *JAMA*. 2008;299:296-307.

69 Maimaitiming S, Roussel R, Hadjadj S, Fumeron F, Aubert R, Emery N, et al. Association of common variants in NPPA and NPPB with blood pressure does not translate into kidney damage in a general population study. *J Hypertens*. 2010;28:1230-3.

70 Franceschini N, Reiner AP, Heiss G. Recent findings in the genetics of blood pressure and hypertension traits. *Am J Hypertens*. 2010;24:392-400.

71 Conen D, Cheng S, Steiner LL, Buring JE, Ridker PM, Zee RY. Association of 77 polymorphisms in 52 candidate genes with blood pressure progression and incident hypertension: The Women's Genome Health Study. *J Hypertens*. 2009;27:476-83.

72 Newton-Cheh C, Larson MG, Vasan RS, Levy D, Bloch KD, Surti A, et al. Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure. *Nat Genet*. 2009;41:348-53.

73 Semenza GL. O2-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol*. 2004;96:1173-7.

74 He Q, Fan C, Yu M, Wallar G, Zhang ZF, Wang L, et al. Associations of ACE gene insertion/deletion polymorphism, ACE activity, and ACE mRNA expression with hypertension in a Chinese population. *PLoS One*. 2013;8:e75870.

75 Conen D, Glynn RJ, Buring JE, Ridker PM, Zee RY. Association of renin-angiotensin and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with blood pressure progression and incident hypertension: prospective cohort study. *J Hypertens*. 2008;26:1780-6.

76 Soubrier AB, Davies E, Jeunemaitre X, Féry I, Charru A, Clauser E, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*. 1994;24:7.

77 Mehri S, Mahjoub S, Hammami S, Zaroui A, Frih A, Betbout F, et al. Renin-angiotensin system polymorphisms in relation to hypertension status and obesity in a Tunisian population. *Mol Biol Rep*. 2011;39:4059-65.

78 Ramachandran V, Ismail P, Stanslas J, Shamsudin N, Moin S, Mohd Jas R. Association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus in Malaysian subjects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2009;9:208-14.

79 Goyache-Goni B, Aranda-Lara P, Reyes-Engels A, Frutos-Sanz MA, Hernandez-Marrero D. The influence of renin-angiotensin system genotypes on the antiproteinuric response to high doses of olmesartan in non-diabetic proteinuric nephropathies. *Nefrologia*. 2013;33:771-8.

80 White PC, Slutsker L. Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res*. 1995;21:437-42.

81 Tsukada K, Ishimitsu T, Teranishi M, Saitoh M, Yoshii M, Inada H, et al. Positive association of CYP11B2 gene polymorphism with genetic predisposition to essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2002;16:789-93.

82 Rajan S, Ramu P, Umamaheswaran G, Adithan C. Association of aldosterone synthase (CYP11B2 C-344T) gene polymorphism & susceptibility to essential hypertension in a south Indian Tamil population. *Indian J Med Res*. 2010;132:379-85.

83 Suonsyrja T, Hannila-Handelberg T, Fodstad H, Donner K, Kontula K, Hiltunen TP. Renin-angiotensin system and alpha-adducin gene polymorphisms and their relation to responses to antihypertensive drugs: results from the GENRES study. *Am J Hypertens*. 2009;22:169-75.

84 Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364:937-52.

85 WHO - *Obesity and overweight*. WHO. 2013.

86 Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, et al. IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88 Suppl 1:2-19.

87 Association AD. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2011.

88 Albareda M, Rodriguez-Espinosa J, Murugo M, de Leiva A, Corcoy R. Assessment of insulin sensitivity and beta-cell function from measurements in the fasting state and during an oral glucose tolerance test. *Diabetologia*. 2001;43:1507-11.

89 Iber CA-I, S., Chesson, A. L. Jr.; Quan, S. F. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specifications. 2007;1.

90 Bittencourt LR, Haddad FM, Dal Fabbro C, intra FD, Rios L. Abordagem geral do paciente com síndrome da apneia obstrutiva do sono. *Rev Bras Hipertens*. 2009;16:158-63.

91 Boudoulas KD, Vlachopoulos C, Raman SV, Sparks EA, Triposciadis F, Stefanadis C, et al. Aortic function: from the research laboratory to the clinic. *Cardiology*. 2012;121:31-42.

92 Wang F, Ye P, Luo L, Xiao W, Qi L, Bian S, et al. Association of serum lipids with arterial stiffness in a population-based study in Beijing. *Eur J Clin Invest*. 2011;41:929-36.

93 Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, et al. Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing age in healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2004;43:1239-45.

94 Torrado J, Farro I, Bia D, Zocalo Y, Valls G, Valero M, et al. Levels and rates of change in carotid-radial pulse wave velocity associated with reactive hyperaemia: Analysis of the dependence on transient ischemia length. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2010;2010:2865-8.

95 Di Iorio BR, Cucciniello E, Alinei P, Torraca S. Reproducibility of regional pulse-wave velocity in uremic subjects. *Hemodial Int.* 2010;14:441-6.

96 Stefanadis C, Vlachopoulos C, Karayannacos P, Boudoulas H, Stratos C, Filippides T, et al. Effect of vasa vasorum flow on structure and function of the aorta in experimental animals. *Circulation*. 1995;91:2669-78.

97 Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*. 2009;169:505-14.

98 Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25:169-93.

99 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2002;25:402-8.

100 Kryger MHR, T.; Dement, W. C. *Principles and practice of sleep medicine*. St Louis, Missouri, EUA: Elsevier Saunders; 2011.

101 Gupta AK, Nasothimiou EG, Chang CL, Sever PS, Dahlof B, Poulter NR. Baseline predictors of resistant hypertension in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcome Trial (ASCOT): a risk score to identify those at high-risk. *J Hypertens*. 2011;29:2004-13.

102 Persell SD. Prevalence of resistant hypertension in the United States, 2003-2008. *Hypertension*. 2011;57:1076-80.

103 Ben-Dov IZ, Kark JD, Ben-Ishay D, Mekler J, Ben-Arie L, Bursztyn M. Predictors of all-cause mortality in clinical ambulatory monitoring: unique aspects of blood pressure during sleep. *Hypertension*. 2007;49:1235-41.

104 de la Sierra A, Banegas JR, Oliveras A, Gorostidi M, Segura J, de la Cruz JJ, et al. Clinical differences between resistant hypertensives and

patients treated and controlled with three or less drugs. *J Hypertens*. 2012;30:1211-6.

105 Zarychanski R, Houston DS. Anemia of chronic disease: a harmful disorder or an adaptive, beneficial response? *CMAJ*. 2008;179:333-7.

106 Villarroel HP, Arredondo OM, Olivares GM. Hepcidin as a central mediator of anemia of chronic diseases associated with obesity. *Rev Med Chil.* 2013;141:887-94.

107 Atsma F, Veldhuizen I, de Kort W, van Kraaij M, Pasker-de Jong P, Deinum J. Hemoglobin level is positively associated with blood pressure in a large cohort of healthy individuals. *Hypertension*. 2012;60:936-41.

108 Venning EH, Dyrenfurth I, Dossetor JB, Beck JC. Essential hypertension and aldosterone. *Circulation*. 1961;23:168-76.

109 Vasan RS, Evans JC, Larson MG, Wilson PW, Meigs JB, Rifai N, et al. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. *N Engl J Med*. 2004;351:33-41.

110 Sartori M, Calo LA, Mascagna V, Realdi A, Macchini L, Ciccariello L, et al. Aldosterone and refractory hypertension: a prospective cohort study. *Am J Hypertens*. 2006;19:373-9; discussion 80..

111 Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA. Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med*. 2003;139:761-76.

112 Allen RP, Picchietti D, Hening WA, Trenkwalder C, Walters AS, Montplaisi J. Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. A report from the restless legs syndrome diagnosis and epidemiology workshop at the National Institutes of Health. *Sleep Med*. 2003;4:101-19.

113 Grigg-Damberger MM. The AASM Scoring Manual four years later. *J Clin Sleep Med*. 2012;8:323-32.

114 Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA*. 2000;284:3015-21.

115 Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1217-39.

116 Shaw R, Bosworth HB. Baseline medication adherence and blood pressure in a 24-month longitudinal hypertension study. *J Clin Nurs*. 2011;21:1401-6.

117 Mion D, Jr.; Ortega, K. C. Tratamento medicamentoso da hipertensão arterial: adesão ao tratamento. In: Brandão AAA, C.; Nobre, F., ed. *Hipertensão*. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2012:377-83.

118 V Brazilian guidelines for ambulatory monitoring of arterial pressure and III Brazilian guidelines for home monitoring of blood pressure. *J Bras Nefrol*. 2011;33:365-88.

119 Davies CW, Crosby JH, Mullins RL, Barbour C, Davies RJ, Stradling JR. Case-control study of 24 hour ambulatory blood pressure in patients with obstructive sleep apnoea and normal matched control subjects. *Thorax*. 2000;55:736-40.

120 Marrone O, Romano S, Insalaco G, Bonsignore MR, Salvaggio A, Bonsignore G. Influence of sampling interval on the evaluation of nocturnal blood pressure in subjects with and without obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*. 2000;16:653-8.

121 Punjabi NM, Shahar E, Redline S, Gottlieb DJ, Givelber R, Resnick HE. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol*. 2004;160:521-30.

122 Priou P, Le Vaillant M, Meslier N, Chollet S, Masson P, Humeau MP, et al. Independent association between obstructive sleep apnea severity and glycated hemoglobin in adults without diabetes. *Diabetes Care*. 2012;35:1902-6.

123 Lindberg E, Theorell-Haglow J, Svensson M, Gislason T, Berne C, Janson C. Sleep apnea and glucose metabolism: a long-term follow-up in a community-based sample. *Chest*. 2012;142:935-42.

124 Togeiro SM, Carneiro G, Ribeiro Filho FF, Zanella MT, Santos-Silva R, Taddei JA, et al. Consequences of obstructive sleep apnea on metabolic profile: a Population-Based Survey. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21:847-51.

125 Bostrom KB, Hedner J, Melander O, Grote L, Gullberg B, Rastam L, et al. Interaction between the angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and obstructive sleep apnoea as a mechanism for hypertension. *J Hypertens*. 2007;25:779-83.

126 Koyama RG, Drager LF, Lorenzi-Filho G, Cintra FD, Pereira AC, Poyares D, et al. Reciprocal interactions of obstructive sleep apnea and hypertension associated with ACE I/D polymorphism in males. *Sleep Med*. 2009;10:1107-11.

127 Ogus C, Ket S, Bilgen T, Keser I, Cilli A, Gocmen AY, et al. Insertion/deletion polymorphism and serum activity of the angiotensin-converting enzyme in Turkish patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Biochem Genet*. 2010;48:516-23.

128 Mishra HK, Sharma SK, Sreenivas V. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in north Indian population with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*. 2013;17:1029-37.

129 Lin H, Lin D, Zheng C, Li J, Fang L. Association of ACE I/D polymorphism with obstructive sleep apnea susceptibility: evidence based on 2,228 subjects. *Sleep Breath.* 2013 Nov 24.

130 Yakut T, Karkucak M, Ursavas A, Gulten T, Burgazlioglu B, Gorukmez O, et al. Lack of association of ACE gene I/D polymorphism with obstructive sleep apnea syndrome in Turkish patients. *Genet Mol Res*. 2010;9:734-8.

131 Holliday R. Mechanisms for the control of gene activity during development. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1990;65:431-71.