Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti

Estudo de polimorfismos genéticos em portadores de hipertensão arterial resistente controlada e não controlada

Dissertação apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Entidade Associada da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Mestrado Profissional Associado à Residência em Medicina Cardiovascular

Área de Concentração: Prevenção, Diagnóstico e Tratamento em Medicina Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Flávio Antônio de Oliveira Borelli

São Paulo

2019

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cavalcanti, Luiz Henrique da Silveira

Estudo de polimorfismos genéticos em portadores de hipertensão arterial resistente controlada e não controlada / Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti. -- São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia Universidade de São Paulo. Mestrado Profissional Associado à Residência em Medicina Cardiovascular.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Antônio de Oliveira Borelli

Descritores: 1. Hipertensão. 2. Genética. 3. Resistência a Medicamentos. 4. Polimorfismo Genético

USP/IDPC/Biblioteca/007/19

Nome: CAVALCANTI, Luiz Henrique da Silveira

Título: Estudo de polimorfismos genéticos em portadores de hipertensão arterial resistente controlada e não controlada

Dissertação apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Entidade Associada à Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

À minha querida mãe Maria Goreth, em quem procuro me espelhar diariamente e que nunca deixou de me apoiar nesta trajetória. Perdeu a vida precocemente durante a elaboração deste trabalho, mas estará sempre ao lado de Deus guiando meus passos. Te dedico esta e todas as minhas conquistas daqui para frente!

Ao meu Pai Adão e meus irmãos Vinícius e Gyovanna, que também foram alicerce para a conclusão deste objetivo. Espero que recompensas como esta possam amenizar todos esses anos longe de vocês.

À minha namorada Bruna, que me acompanhou de perto durante todos os desafios deste Mestrado. Que ainda possamos comemorar a concretização de muitos objetivos juntos!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Flávio Borelli, que se fez presente não só como orientador, mas também como suporte nos momentos difíceis que passei durante a elaboração deste projeto.

Ao Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata, à coordenadora do laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia Prof. Dra. Gisele Bastos e à Prof. Dra. Camila Borelli Zeller, pela forma com que cada um contribuiu para o sucesso do meu Mestrado.

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, instituição que hoje é minha segunda casa e me acolheu tão bem, proporcionando a oportunidade de concluir este trabalho.

Aos pacientes, que assistiram de perto meus primeiros passos, compreenderam meus erros e permitiram meus acertos.

À Deus, nosso criador, que me guiou nesta jornada e permitiu a conclusão de mais esta etapa da minha vida profissional.

*“A única maneira de fazer um excelente
trabalho é amar o que você faz.”*

Steve Jobs (1955-2011)

Normalização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta apresentação:

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses da USP - Parte IV (Vancouver); 3ª edição - São Paulo: 2016. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento, Suely Campos Cardoso.

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

RESUMO

Cavalcanti, L.H.S. Estudo de polimorfismos genéticos em portadores de hipertensão arterial resistente controlada e não controlada. [Dissertação]. São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A Hipertensão arterial resistente (HAR) é uma condição que está associada a aumento do risco de desfechos cardiovasculares adversos e morte. Estudos demonstram que idade, obesidade, diabetes, doença renal crônica, apnéia obstrutiva do sono e descendência africana têm sido correlacionados com resistência ao tratamento antihipertensivo. Entretanto, tais elementos justificam apenas parcialmente a incidência de HAR, o que sugere que outros contribuintes, incluindo fatores genéticos, podem estar presentes nesta população. **Objetivos:** O objetivo primário é avaliar a associação entre o controle da pressão arterial (PA) e a frequência genotípica encontrada nos polimorfismos rs1801252 e rs1801253 do gene *ADRB1*, rs699 do gene *AGT* e rs2297518 do gene *NOS2* em pacientes com HAR. De modo secundário, nosso objetivo é descrever o perfil fenotípico dos hipertensos resistentes atendidos no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e comparar as frequências alélicas encontradas neste estudo com as descritas na literatura. **Métodos:** Estudo observacional, de caráter transversal, unicêntrico, realizado através de pesquisa genética em pacientes atendidos em ambulatório especializado. Os indivíduos foram divididos em 2 grupos: HAR controlada e não controlada. Na análise estatística, o teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar se existiam diferenças nas proporções de cada uma das variáveis de interesse nos grupos com HAR controlada e não controlada. O teste qui-quadrado de Pearson foi utilizado para avaliar se havia diferenças nas frequências relativas dos genótipos de cada polimorfismo avaliado. Foi considerado significativo $P < 0,05$. **Resultados:** A amostra total de hipertensos resistentes foi constituída de 142 pacientes, incluindo 82 controlados e 60 não controlados. Das características iniciais, apenas a presença de hipertrofia ventricular esquerda ($p=0,008$), a quantidade de anti-hipertensivos em uso ($p=0,03$), além dos valores pressóricos no consultório e na MAPA apresentaram diferença estatística significativa entre aqueles com HAR controlada e não controlada. As frequências genotípicas que envolveram os polimorfismos rs1801252 e rs1801253 do gene *ADRB1* não apresentaram diferença significativa ($p=0.583$ e $p=0.180$,

respectivamente). Entretanto, quando realizamos a comparação através do modelo alélico, houve uma maior tendência de controle da pressão arterial naqueles pacientes com o alelo G em homozigose ($p= 0,092$). Adicionalmente, as prevalências dos genótipos encontradas nos polimorfismos *rs699* do gene *AGT* e *rs2297518* do gene *NOS2* também não foram diferentes entre os dois grupos ($p=0.659$ e $p=0,950$ respectivamente). Conclusão: As frequências genotípicas dos polimorfismos envolvendo os genes *ADRB1*, *AGT* e *NOS2* não diferiram entre os hipertensos resistentes com bom controle pressórico e aqueles com controle inadequado, sugerindo que estas variantes não tenham grande impacto na refratariedade ao tratamento deste restrito grupo de pacientes. Entretanto, estudos maiores sobre o assunto são essenciais para que possamos entender melhor as vias fisiopatológicas envolvidas na HAR e consigamos ajudar no desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas para esta população.

Palavras-chave: Hipertensão. Genética. Resistência a Medicamentos. Polimorfismo Genético.

SUMMARY

Cavalcanti, L.H.S. Study of genetic polymorphisms in patients with controlled and uncontrolled resistant hypertension. [Dissertation]. São Paulo: Dante Pazzanese Institute of Cardiology, University of São Paulo; 2019

Introduction: Resistant hypertension (RH) is a disease that is associated with increased risk of adverse cardiovascular outcomes and death. Studies have shown that age, obesity, diabetes, chronic kidney disease, obstructive sleep apnea and African origin have been correlated with resistance status to antihypertensive treatment. However, such factors only partially justify the incidence of HAR, which suggests that other contributors, including genetic factors, may be present in this population. **Objectives:** The primary objective is to evaluate the association between blood pressure (BP) control and the genotypic frequency found in polymorphisms *rs1801252* and *rs1801253* of the *ADBR1* gene, *rs699* of the *AGT* gene and *rs2297518* of the *NOS2* gene in patients with RH. Secondly, our objective is to describe the phenotypic profile of the resistant hypertensives treated in Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia and to compare the allelic frequencies found in this study with those described in the literature. **Methods:** Cross-sectional observational study, unicentric, performed through genetic research in patients attended at a specialized outpatient clinic. Subjects were divided into 2 groups: controlled and uncontrolled RH. In the statistical analysis, Fisher's exact test was used to evaluate the differences in the proportions of each of the variables of interest in the groups with controlled and uncontrolled RH. Chi-square test was used to evaluate the differences in genotype frequencies of each polymorphism evaluated. Significant P was < 0.05. **RESULTS:** A total sample of 142 resistant hypertensive patients was enrolled, including 82 controlled and 60 uncontrolled. Of the initial characteristics, only the presence of left ventricular hypertrophy ($p = 0.008$), the number of antihypertensive drugs in use ($p = 0.03$), in addition to office BP values and ABPM, showed a statistically significant difference between groups. The genotypic frequencies that involved the *rs1801252* and *rs1801253* polymorphisms of the *ADRB1* gene did not present significant difference ($p = 0.583$ and $p = 0.180$, respectively). However, when comparing using the allelic model, there was a tendency for blood pressure control in those patients with the G allele homozygous ($p = 0.092$). In addition, the prevalence of the genotypes found

in *rs699* polymorphism of the *AGT* gene and *rs2297518* variant of the *NOS2* gene also did not reach statistical significance ($p = 0.659$ and $p = 0,950$ respectively). Conclusion: The genotypic frequencies of the polymorphisms originating from *ADRB1*, *AGT* and *NOS2* genes did not differ between resistant hypertensives with good blood pressure control and those with inadequate control, suggesting that these variants do not have much impact on the treatment refractoriness of this restricted group of patients. However, larger studies on the subject are essential in order to better understand the pathophysiological pathways involved in RAH and to help in the development of new therapeutic interventions for this population.

Key words: Hypertension. Genetics. Resistance to Medications. Genetic Polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	20
Figura 2.....	21
Figura 3.....	23
Figura 4.....	24
Figura 5.....	25
Figura 6.....	27
Figura 7.....	33
Figura 8.....	42
Figura 9.....	43
Figura 10.....	43
Figura 11.....	44
Figura 12.....	49
Figura 13.....	50
Figura 14.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	36
Tabela 2.....	38
Tabela 3.....	39
Tabela 4.....	40
Tabela 5.....	42
Tabela 6.....	43
Tabela 7.....	44
Tabela 8.....	45
Tabela 9.....	47
Tabela 10.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADRA	Receptor Alfa Adrenérgico
ADRB	Receptor Beta Adrenérgico
AGT	Angiotensinogênio
AHA	American Heart Association
AT1	Receptor de Angiotensina II tipo 1
AT2	Receptor de Angiotensina II tipo 2
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BCC	Bloqueador de Canal de Cálcio
BRA	Bloqueador de Receptor de Angiotensina
CICr	Clearence de Creatinina
DAC	Doença Arterial Coronariana
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
FC	Frequência Cardíaca
GWAS	Genome Wide Association Studies
HR	Hazard Ratio
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de Confiança
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia
MAPA	Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NOS	Óxido Nítrico Sintase
IMC	Índice de Massa Corpórea
NOS2	Óxido Nítrico Sintase induzível
PA	Pressão Arterial
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PCR	Reação de Cadeia pela Polimerase

SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE SÍMBOLOS

>	Maior que
mm	Milímetros
Hg	Mercúrio
%	Por cento
Hs	Horas
B	Beta
A	Alfa
<i>Arg</i>	Arginina
<i>Gly</i>	Glicina
<i>Ser</i>	Serina
<i>Met</i>	Metionina
<	Menor que
=	Igual a
Kg	Quilograma
m ²	Metro quadrado
mL	Mililitro
Min	Minuto
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Geral.....	30
2.2. Específicos.....	30
3. MÉTODOS.....	31
3.1. Tipo de Estudo.....	31
3.2. Local e período da pesquisa.....	31
3.3. População do estudo.....	31
3.4. Critérios de inclusão.....	31
3.5. Critérios de exclusão.....	32
3.6. Protocolo experimental.....	32
3.7. Medida da pressão arterial.....	33
3.8. Monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA).....	34
3.9. Exames laboratoriais.....	35
3.10. Análise dos polimorfismos.....	35
3.11. Método estatístico.....	36
3.12. Aspectos éticos e legais.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Características gerais da população.....	38
4.2. Características específicas dos grupos.....	40
4.3. MAPA.....	42
4.4. Polimorfismos genéticos.....	44
4.4.1. Gene do receptor adrenérgico Beta 1 (<i>ADRB1</i>)	45
4.4.2. Gene do angiotensinogênio (<i>AGT</i>).....	46
4.4.3. Gene da óxido nítrico sintase induzível (<i>NOS2</i>)	46

4.4.4. Comportamento dos polimorfismos entre brancos e negros.....	47
5. DISCUSSÃO.....	48
5.1. População do estudo.....	48
5.2. Polimorfismos genéticos.....	48
5.2.1. Gene do receptor Beta 1 (<i>ADRB1</i>)	48
5.2.2. Gene do angiotensinogênio (<i>AGT</i>).....	51
5.2.3. Gene da óxido nítrico sintase induzível (<i>NOS2</i>)	52
5.2.4. Considerações finais.....	53
5.3. Limitações do estudo.....	53
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8. ANEXOS.....	63
8.1. Anexo A – Modelo do TCLE aprovado pelo CEP.....	63
8.2. Anexo B – Aprovação do projeto pelo CEP.....	68
9. APÊNDICES.....	72
9.1. Apêndice A – Questionário de aderência elaborado por Morisky Grenn.....	72

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial bastante prevalente em nosso meio, que está associada à elevada morbidade e mortalidade cardiovascular e cerebrovascular. A relação entre pressão arterial (PA) e eventos cardiovasculares/renais é contínua, o que faz com que a distinção entre normotensão e hipertensão baseada em um único valor de corte seja um pouco arbitrária. (1,2,3)

Grandes estudos epidemiológicos mostram que a partir de valores de PA sistólica (PAS) $> 115\text{mmHg}$ já existe aumento do risco cardiovascular (2). Entretanto, o termo “hipertensão” é melhor entendido como o valor de PA a partir do qual os benefícios do tratamento instituído superam os riscos inerentes a ele. Neste sentido, a diretriz brasileira sobre o tema define hipertensão como níveis pressóricos acima de $140 \times 90\text{ mmHg}$. (4)

A prevalência de hipertensão entre os adultos é de aproximadamente 30-45% (5), sendo que na população geral gira em torno de 24% dos homens e 20% das mulheres. (6) Apesar dos dados no Brasil serem escassos, essa elevada prevalência se mostrou consistente ao redor do mundo, mesmo comparando países desenvolvidos e subdesenvolvidos. (5) Com o envelhecimento da população, adoção de hábitos sedentários e aumento da obesidade, a prevalência da hipertensão continuará a crescer. Estima-se que o número de pessoas hipertensas irá aumentar 15-20% até 2025, atingindo 1.5 bilhão de pessoas. (7)

A patogênese da HAS não é completamente entendida, porém provavelmente envolve a interação de numerosos fatores genéticos e ambientais que possuem múltiplos efeitos sobre a função e estrutura do sistema cardiovascular e renal. Os principais fatores determinantes da PA são o sistema nervoso simpático, o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o volume plasmático (em grande parte mediado pelos rins). (8)

O controle adequado dos níveis de pressão arterial (PA) reduz o risco de complicações, entretanto estima-se que apenas cerca de um terço da população hipertensa consegue controlar sua pressão arterial com os fármacos utilizados nos grandes ensaios clínicos. No Brasil, 14 estudos populacionais realizados entre 1994 e 2009, revelaram baixos níveis de controle da PA, com média de 19,6%. (9)

O conceito de hipertensão “resistente ao tratamento” existe praticamente desde o advento da terapia anti-hipertensiva medicamentosa nos anos 1950s, com definições variáveis desde então. (10-11) Referências iniciais a este fenótipo geralmente descreviam pacientes com PA continuamente elevada apesar do uso de múltiplas drogas anti-hipertensivas. (12)

Até a última década, pouca atenção era dada à hipertensão resistente pela literatura. Em 2008, a *American Heart Association* (AHA) definiu hipertensão arterial resistente (HAR) como pressão arterial não controlada apesar do uso de pelo menos três anti-hipertensivos em dose otimizada, sendo um deles preferencialmente um diurético ou a pressão arterial controlada com uso de quatro fármacos. (13) Recentemente, o termo hipertensão refratária tem sido usado em referência a um subgrupo pequeno de pacientes que não atingem o controle pressórico em terapia máxima com pelo menos 5 anti-hipertensivos (Figura1). (14)

Figura 1 – Hipertensão controlada X não controlada X resistente X refratária.

FONTE: Adaptado de Dudenbostel T, 2016.

Desde então, numerosos estudos têm documentado aumento do risco de desfechos cardiovasculares adversos e morte, além de piora na qualidade de vida dos pacientes com HAR. (15-17)

No Brasil, o estudo ReHot encontrou uma prevalência de hipertensos resistentes de 11.7%, incluindo pacientes em todo o país. (18) Esta prevalência aumenta com o envelhecimento, aumento de massa ponderal, sedentarismo e apnéia do sono. (19,20) Aqueles com HAR verdadeira possuíam maior chance de acidente vascular encefálico, insuficiência cardíaca, diabetes melito (DM), maior proporção de participantes com ausência de descenso noturno do sono, menor taxa de filtração glomerular e doença renal em estágio terminal. (18)

As evidências atuais sugerem que o desenvolvimento de HAR é provavelmente multifatorial, mas as vias fisiopatológicas envolvidas permanecem pouco entendidas. (21) Estes mecanismos incluem excesso de retenção de fluido (devido numerosas causas, incluindo ingestão excessiva de sódio), excesso de aldosterona circulante devido a ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), ativação do sistema nervoso simpático (SNS), remodelamento vascular e enrijecimento arterial (Figura 2). (22)

Figura 2 - Mecanismos envolvidos na Hipertensão Arterial Resistente

FONTE: Adaptado de Hwang, 2017.

Legenda: SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS: Sistema Nervoso Simpático; RVS: Resistência Vascular Sistêmica

O excesso da ingestão de sódio e consequente aumento na retenção de fluido têm um papel importante na fisiopatologia da HAR. Em condições normais, alterações hemodinâmicas diminuem a resistência vascular e aumentam a excreção renal de sódio para manter a pressão arterial constante no contexto do excesso de volume. Entretanto, pacientes com HAR podem ter sensibilidade aumentada ao sódio, levando

a um menor impacto destes mecanismos contra regulatórios. Além disso, a ingestão crônica de sódio em excesso pode levar a disfunção endotelial, mesmo entre os indivíduos normosensíveis ao sódio. (23)

O papel do excesso de volume na HAR é sugerido por evidências prévias que mostraram melhora significativa no controle da PA após otimização da terapia diurética. (24-26) Adicionalmente, alguns estudos têm documentado expansão intravascular entre pacientes com HAR através da demonstração de impedância torácica elevada e do aumento na concentração de peptídeo natriurético. (24,27)

O SRAA desempenha um importante papel na homeostase da resistência vascular e regulação da PA. A angiotensina II, através da ativação do receptor de angiotensina tipo 1 (AT1), é um potente vasoconstrictor arteriolar e promove retenção de sal e água. (28) Em contraste, a excreção de sódio ocorre pela ativação do receptor de angiotensina tipo 2 (AT2) nos rins. A ativação crônica do SRAA pode contribuir ainda mais para expansão do volume plasmático em pacientes com HAR através da diminuição da natriurese pressórica que ocorre nestes indivíduos. (29)

Além disso, a via da óxido nítrico sintase ajuda na contra regulação dos efeitos vasoconstrictores do SRAA. (30) Em pacientes com HAR esta via pode estar inibida, contribuindo para um aumento ainda maior dos valores pressóricos provocados por um SRAA não contrabalanceado. (31)

A Aldosterona, um mineralocorticoide secretado pelo córtex adrenal em resposta à angiotensina II, desempenha um complexo papel na regulação de sódio e balanço de água no ducto coletor distal dos rins. Sua ação clássica na patogênese da hipertensão é promover retenção de sódio e água nos néfrons, porém evidências recentes sugerem efeitos adicionais na vasculatura através da promoção de inflamação, rigidez arterial e stress oxidativo, que podem contribuir para o desenvolvimento de HAR. (28,29,32)

A via do SRAA a nível do sistema nervoso central também pode estar implicada no desenvolvimento da HAR. (29,33) Diferentemente do que acontece a nível renal, onde ocorre *downregulation* no contexto de sobrecarga de sódio, o SRAA cerebral se torna ativado em resposta ao aumento da ingestão salina, fazendo com que, através de *feedback* positivo, os rins promovam mais retenção de sódio. Acredita-se que grande parte destes efeitos possam ser mediados pelo receptor AT1 no cérebro. (29)

De forma adicional, também se observa produção aumentada de aldosterona no cérebro, levando ao aumento da atividade do SNS a nível renal. (33)

O SNS também tem sido implicado no desenvolvimento e manutenção da hipertensão. A atividade de nervos periféricos simpáticos e a taxa de liberação de noradrenalina pelos rins parecem estar aumentadas na população geral de hipertensos. (34) Em nível renal, as fibras simpáticas eferentes são responsáveis pela diminuição do fluxo sanguíneo a este órgão, pela liberação de renina e retenção de sódio (Figura 3). Já as fibras aferentes mantêm sinapse com neurônios do sistema nervoso central estimulando a atividade simpática e contribuindo para o componente neurogênico da hipertensão arterial. (35) Ou seja, o SNS renal, por meio de sua atividade eferente, leva a retenção de sal e água via estímulo dos receptores alfa adrenérgicos, além de ativação do sistema renina angiotensina aldosterona via receptores adrenérgicos beta 1. Por outro lado, as fibras aferentes renais modulam diretamente o SNS a nível central. (36)

Figura 3 - Mecanismos da atividade simpática a nível renal

FONTE: Apatado de Deepak Ameta, 2014.

Evidências sugerem o envolvimento do SNS em pacientes com HAR, principalmente naqueles com hipertensão refratária, que parecem depender menos do mecanismo do excesso de volume e mais da hiperatividade do simpático. (37) Dudenbostel e colaboradores mostraram que hipertensos refratários possuíam maior frequência cardíaca (FC) no Holter de 24hs e menor variabilidade da FC comparados

aos pacientes com HAR controlada, ambos marcadores de atividade simpática aumentada. Além disso, foram encontrados maiores níveis de normetanefrina urinária, além de maior resistência periférica e rigidez arterial naqueles com hipertensão refratária, mostrando uma contribuição importante do tônus simpático aumentado neste subgrupo de hipertensos. (38)

Atualmente, o tratamento do portador de hipertensão resistente não difere muito dos demais hipertensos. Consiste na modificação do estilo de vida, descontinuação de substâncias que interfiram na PA e adição sequencial de anti-hipertensivos ao esquema tríplice inicial em doses otimizadas (diurético tiazídico + bloqueadores do canal de cálcio + inibidores do SRAA); contudo, a adesão ao tratamento instituído é inversamente proporcional ao número de fármacos prescritos, contribuindo para o mau controle da pressão arterial (4,40).

Figura 4 - Manejo da Hipertensão Resistente

FONTE: I posicionamento brasileiro sobre hipertensão arterial resistente, 2012.

Uma avaliação inicial adequada para exclusão de pseudoresistência e de causas potenciais de hipertensão secundária deve ser realizada antes de se iniciar o manejo farmacológico para HAR (Figura 4). A análise minuciosa da história medicamentosa, incluindo aderência às medicações anti-hipertensivas, e a necessidade de confirmação de elevação da PA pela monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA) revela a maioria dos casos de pseudoresistência. (4,9,40) O diagnóstico de hipertensão secundária deve ser buscado ativamente nos casos de

hipertensão resistente. Na maioria dos casos, estes pacientes não têm HAR verdadeira e a terapia direcionada à causa da HAS secundária geralmente reduz substancialmente a necessidade de anti-hipertensivos. (41)

A otimização da terapia diurética é particularmente importante dada a sobrecarga de volume frequentemente presente na HAR, preferindo-se o uso da Clortalidona dentre os tiazídicos. (42) As evidências atuais suportam o uso de antagonistas da aldosterona como a 4ª droga preferencial em hipertensos resistentes. A espironolactona, em especial, tem mostrado redução significativa na PA sistólica sem hipercalemia ou insuficiência renal aguda significativas, sugerindo um importante papel destes agentes na sobrecarga de volume. (18,43)

Já entre os hipertensos refratários, não se sabe se os antagonistas da aldosterona são tão efetivos, porém sabendo-se que a sobrecarga de volume parece ter uma influência menor neste subgrupo, os agentes com ação no SNS podem ser mais efetivos na população com hipertensão refratária (Figura 5). (22)

Figura 5 – Algoritmo de tratamento da HAR baseado nos possíveis mecanismos envolvidos

FONTE: Adaptado de Hwang, 2017.

Legenda: BCC: Bloqueador do Canal de Cálcio; IECA: Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina; BRA: Bloqueador do Receptor de Angiotensina; SNS: Sistema Nervoso Simpático

Existem poucas evidências disponíveis acerca do uso de outras classes de anti-hipertensivos como terapias adicionais na HAR. Dados recentes da literatura sugerem o uso de bloqueadores α_1 , agonistas α_2 , β -bloqueadores e vasodilatadores

periféricos como agentes potenciais de segunda-linha para HAR, e em alguns casos, como uma alternativa aos antagonistas da aldosterona. A escolha de um agente específico depende de múltiplos fatores, como idade, tolerância ao fármaco, comorbidades e mecanismos possivelmente envolvidos na resistência ao tratamento. (44)

Mesmo com tantas opções terapêuticas, sabe-se que os hipertensos não respondem de forma semelhante aos tratamentos estabelecidos, o que poderia ser explicado pela influência de múltiplos fatores (45). Dentre eles, idade, obesidade, DM, doença renal crônica, apnéia obstrutiva do sono, descendência africana e disfunção endotelial têm sido correlacionados com resistência ao tratamento antihipertensivo. (18,20,46) Entretanto, tais elementos justificam apenas parcialmente a incidência de HAR, o que sugere que outros contribuintes, incluindo fatores genéticos, podem estar presentes nesta população. (47)

Determinantes genéticos da hipertensão humana ainda não são tão bem entendidos, embora polimorfismos em vários genes tenham sido associados a elevações nos níveis pressóricos. Apesar disso, o progresso da pesquisa genética envolvendo o fenótipo extremo da HAR tem sido um pouco mais lento. (48)

Nesse contexto, cada vez mais são desenvolvidos os chamados estudos de associação genômica ampla, do inglês *Genome Wide Association Studies (GWAS)*, que têm por finalidade analisar centenas ou milhares de polimorfismos em todo o genoma ao mesmo tempo, com objetivo de identificar associações a caracteres fenotípicos de interesse. (49)

Os chamados polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) são variações na sequência do genoma que afetam uma única base nitrogenada em um determinado local cromossômico (locus). Estima-se que existam aproximadamente 10 milhões de *SNPs* no genoma humano. Estas variações devem ocorrer em no mínimo 1% de uma determinada população para serem consideradas como um *SNP* e constituem 90% de todas as variações genômicas humanas. Além de poder acarretar mudanças morfológicas, essas variações na sequência do DNA podem influenciar a resposta dos organismos a doenças e intervenções terapêuticas. (50)

Figura 6 - Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)

FONTE: Curtis Christian, 2014

Cada polimorfismo de nucleotídeo único presente no banco de dados público sbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) pode ser referido pelo seu identificador único, como por exemplo *rs212570*, em que *rs* se refere a “SNP referência” (na sigla em inglês) e 212570 é um número serial único. (51)

Alguns estudos têm demonstrado uma associação entre polimorfismos em genes de receptores adrenérgicos e hipertensão. Atualmente, aproximadamente 4000 variantes nos genes que codificam estes receptores foram identificadas. Entretanto, não há consenso acerca do impacto destas variantes na pressão arterial, assim como na resposta terapêutica (52).

O genoma humano codifica nove diferentes receptores adrenérgicos. Estes são agrupados em 3 famílias conhecidas como: receptores α_1 (ADRA1, subdivididos em ADRA1A, ADRA1B e ADRA1D), receptores α_2 (ADRA2, subdivididos em ADRA2A, ADRA2B e ADRA2C), e receptores β (ADRB, subdivididos em ADRB1, ADRB2 e ADRB3). (53)

Os receptores β_1 (ADRB1) são mediadores essenciais no acoplamento excitação-contração da célula miocárdica. (54) A estimulação dos receptores β_1 cardíacos é considerado o mecanismo mais importante no aumento do débito cardíaco e é este subtipo de receptor que predomina no miocárdio. Além disso, o controle na liberação de renina a nível renal também explica o papel central dos receptores β_1 no controle da pressão arterial. (52)

A variante mais comum dos ADRB1 se dá através da troca do aminoácido Arginina pela Glicina, na posição 389 da porção C terminal (*rs1801253*), com

frequências estimadas em 27% na população caucasiana e asiática, e 42% nos americanos de origem africana. (55)

Vários estudos têm sugerido uma potencial associação desta variante com hipertensão. Embora os resultados de estudos pequenos sejam bastante divergentes, 3 grandes coortes revelaram que a variante *Arg389* foi associada com risco de hipertensão, sendo esta considerada como “hiperfuncional” comparada com *Gly389*. (56-58) Além disso, *Arg389* parece predispor a respostas mais intensas aos β -bloqueadores. (59)

Outra variante relevante envolvendo receptores adrenérgicos é a *rs1801252*, na qual ocorre a troca do aminoácido Serina pela Glicina, na posição 49. Apesar de ter uma frequência alélica menor (alcançando 13 a 20%), esta alteração genética também mostrou influenciar o controle pressórico através da redução na internalização do receptor β_1 vista nos indivíduos com o alelo *Ser*. (48)

Em suma, a literatura sugere fortemente que variantes polimórficas no gene *ADRB1* têm relevância funcional. Tais achados sugerem que estes genes necessitam de mais estudos acerca de seus efeitos genéticos no controle da pressão arterial.

Como já mencionado anteriormente, além do sistema nervoso simpático e dos seus receptores adrenérgicos, a fisiopatologia envolvida na HAR engloba vários outros mecanismos, incluindo-se a ativação do SRAA e a via da produção de óxido nítrico (28-33). Portanto, avaliações de polimorfismos envolvendo estas vias fisiopatológicas também se fazem importantes.

Neste sentido, um estudo de coorte prospectivo avaliou o polimorfismo *rs41322052* do gene da óxido nítrico sintase (*NOS3*), identificando que o genótipo -786CC aumentava a suscetibilidade ao desenvolvimento de HAR. (60) Adicionalmente, pesquisadores avaliaram o gene da óxido nítrico sintase indutível (*NOS2*) numa população que incluía indivíduos normotensos, hipertensos controlados e resistentes ao tratamento. Mostrou-se que certas variantes genótípicas envolvendo o polimorfismo *rs2297518* eram mais comumente encontradas em pacientes hipertensos (incluindo os resistentes), do que em normotensos ($P=0.016$; $OR=2.05$). (61)

Ademais, a variante *rs 1799998* do gene *CYP 11B2* que codifica a Aldosterona Sintase, foi associada com aumento de aldosterona plasmática em pacientes com HAR, sugerindo possível influência na regulação dos seus níveis. (62)

Já o estudo GENHAT, um dos maiores e mais relevantes sobre o tema, avaliou SNPs de 78 genes em 2203 participantes com HAR e 2354 controles, mostrando-se que duas variantes no gene do angiotensinogênio (*AGT*) - *rs699* (alelo Met235) e *rs5051* (alelo G) - foram associados com aumento no risco de HAR, sendo que a primeira variante se mostrou significativa apenas na população branca. (63) Este achado foi de encontro a um pequeno estudo brasileiro envolvendo 70 pacientes com HAR, o qual mostrou que carreadores afro-americanos da variante *rs699* também tinham chance aumentada de resistência ao tratamento. (64)

Desta forma, a implementação da farmacogenética no tratamento de pacientes hipertensos requer uma estratégia que leve em consideração o potencial de múltiplos polimorfismos genéticos que possam direcionar para determinado tratamento anti-hipertensivo. (65)

Apesar de tantos trabalhos mostrando relação de diversos polimorfismos genéticos com resposta ao tratamento para hipertensão, ainda não está bem estabelecido a utilidade clínica do uso destes marcadores. (66)

Assim, é compreensível que as intervenções farmacológicas não funcionem para todos os indivíduos com HAR. Portanto, é racional que se proponha uma estratificação dos pacientes, levando em conta diversos aspectos, incluindo informações genéticas que possam identificar aqueles propensos a maiores reduções na pressão arterial com a terapêutica instituída. (67)

2. OBJETIVOS:

2.1. Geral:

- Avaliar a associação entre o controle da pressão arterial (PA) e a frequência genotípica encontrada nos polimorfismos *rs1801252* e *rs1801253* do gene *ADBR1*, *rs699* do gene *AGT* e *rs2297518* do gene *NOS2* em pacientes com HAR.

2.2. Específicos:

- Comparar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos *rs1801252*, *rs1801253*, *rs699* e *rs2297518* nos hipertensos resistentes do estudo com a frequência encontrada na literatura vigente;
- Descrever o perfil fenotípico dos hipertensos resistentes atendidos em ambulatório especializado de um hospital terciário.

3. MÉTODOS:

3.1. Tipo de Estudo

Trata-se de estudo observacional, de caráter transversal, unicêntrico, realizado através de pesquisa genética em hipertensos resistentes atendidos em ambulatório especializado, que aceitaram fazer parte e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O modelo do TCLE assinado pelos participantes encontra-se disponível no Anexo A.

3.2. Local e período da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no ambulatório da Seção de Hipertensão Arterial e Nefrologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) durante o período compreendido entre maio de 2018 e abril de 2019.

3.3. População do estudo

A população do estudo foi constituída de pacientes adultos, em acompanhamento ambulatorial regular no IDPC, com diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica há pelo menos 1 ano. Dois subgrupos fizeram parte da população geral avaliada:

- 1 – HAR controlada;
- 2 – HAR não controlada.

3.4. Critérios de inclusão:

- Portadores de Hipertensão Arterial Resistente, conforme definição da AHA (13);

- Adultos com idade > 18 anos e < 80 anos;
- Indivíduos que tenham realizado exame de MAPA no último ano;

3.5. Critérios de exclusão:

- Portadores de HAS secundária (Hiperaldosteronismo, Estenose de artérias renais, Feocromocitoma, Coarctação de Aorta, Tireoidopatias e outros distúrbios endócrinos);
- Uso crônico de medicamentos que possam causar elevação da pressão arterial (Ex: Corticosteróides, anti-inflamatórios não esteroidais, inibidores da calcineurina, anfetamínicos, fórmulas para emagrecimento)
- Insuficiência renal crônica estágio IV ou V, apresentando clearance de creatinina menor ou igual a 30 mL/min/m² (CKD-EPI)
- Disfunção ventricular esquerda moderada a importante (fração de ejeção do ventrículo esquerdo < 35%)
- Pacientes com má aderência (≤ 1 ponto no teste de Morisky-Green)

3.6. Protocolo experimental

Os pacientes do estudo foram selecionados a partir da realização da MAPA no ambulatório de Hipertensão do IDPC. Após análise dos níveis pressóricos do exame, foram selecionados os indivíduos com critérios para HAR, separando-se aqueles controlados dos não controlados.

Todos que preencheram os critérios de inclusão do estudo e aceitaram participar do projeto (assinando o TCLE) foram submetidos à revisão de dados em prontuário, além de anamnese detalhada, incluindo a verificação das classes de anti-hipertensivos em uso e a aplicação do teste de Morisky-Grenn (Apêndice A) para avaliação de aderência medicamentosa. (68)

Adicionalmente, foi realizado exame físico, incluindo medida padronizada da PA, além de coleta de sangue no laboratório de análises clínicas do IDPC para análise dos exames bioquímicos de interesse e no laboratório de investigação molecular em cardiologia para pesquisa dos polimorfismos genéticos propostos (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma do estudo

Legenda: MAPA: Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial; HAR: Hipertensão Arterial Resistente; PA: Pressão Arterial

3.7. Medida da pressão arterial:

A medição de pressão arterial foi realizada de acordo com a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia (4), com equipamentos validados e periodicamente calibrados.

Inicialmente era explicado o procedimento e o paciente era mantido em repouso de 3 a 5 minutos em ambiente calmo. Certificava-se que o paciente não estava com a bexiga cheia, praticou exercícios físicos há pelo menos 60 minutos, ingeriu bebidas alcoólicas, café e alimentos ou fumou nos 30 minutos anteriores. Com relação ao posicionamento, colocava-se o paciente sentado, com pernas descruzadas, pés apoiados no chão, dorso recostado na cadeira e relaxado. Além disso, o braço era colocado na altura do coração, com a palma da mão voltada para cima e as roupas sem garrotear o membro.

Para realização da medição propriamente dita foi determinada a circunferência do braço no ponto médio entre acrômio e olécrano para, em seguida, selecionar-se o manguito de tamanho adequado ao braço. O manguito era colocado 2 a 3 cm acima

da fossa cubital. Em seguida, deixava-se o meio da parte compressiva do manguito centralizado sobre a artéria braquial, estimando-se o nível da pressão arterial sistólica (PAS) pela palpação do pulso radial. Depois, palpava-se a artéria braquial na fossa cubital e colocava-se a campânula ou o diafragma do estetoscópio sem compressão excessiva, prosseguindo a insuflação até ultrapassar 20 a 30 mmHg o nível estimado da PAS obtido pela palpação. Procedia-se a deflação lentamente para determinar a PAS pela ausculta do primeiro som (fase I de Korotkoff). A determinação da pressão arterial diastólica (PAD) era realizada no momento do desaparecimento dos sons (fase V de Korotkoff). Por fim, auscultava-se cerca de 20 a 30 mmHg abaixo do último som para confirmar seu desaparecimento. Se os batimentos persistissem até o nível zero, determinava-se a PAD no abafamento dos sons (fase IV de Korotkoff).

Foram realizadas pelo menos duas medições, com intervalo em torno de um minuto. Medições adicionais eram realizadas se as duas primeiras forem muito diferentes.

3.8. Monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA)

O exame da MAPA era realizado no próprio ambulatório de Hipertensão do IDPC, com aparelhos devidamente calibrados e validados, em seguimento com as normas estabelecidas pelas diretrizes nacionais sobre o assunto. (69)

O aparelho era programado para mediar a PA no mínimo a cada 30 minutos, de forma que, ao final de 24 horas, obtinha-se ao menos 16 medidas válidas no período da vigília e 8 durante o sono. Exames com 20% ou mais de exclusões de medidas eram, provavelmente, resultantes de problemas técnicos do aparelho ou de falta de colaboração do paciente e, portanto, não eram incluídos no estudo.

Os pontos de corte de hipertensão arterial para PA medida pela M.A.P.A. atualmente são definidos por poucos estudos de coorte (70,71) e por diretrizes internacionais. (72,73) Foram considerados como anormais valores médios de: PA nas 24 horas $\geq 130/80$; PA na vigília $\geq 135/85$ e PA no sono $\geq 120/70$.

Além disso, o padrão vigília-sono era caracterizado através da diferença percentual entre as médias de PA nesses dois períodos. O descenso foi considerado normal quando ocorria: redução da PA durante sono, em relação à vigília, entre 10 e

20%; ausente quando havia redução ≤ 0 ; atenuado quando >0 e $<10\%$ ou acentuado caso a PA se reduzisse $>20\%$.

3.9. Exames laboratoriais:

Foram obtidas amostras de sangue periférico, em tubos de Vacutainer, sendo cinco tubos contendo anticoagulante EDTA e um tubo seco. O soro foi utilizado para dosagens laboratoriais de colesterol total e frações, triglicérides, uréia, creatinina, sódio, potássio, ácido úrico e cálcio. Dois tubos com EDTA foram utilizados para realização de hemograma e avaliação da hemoglobina glicada, sendo que os outros três tubos foram utilizados para análise dos polimorfismos. As determinações bioquímicas e o hemograma foram processados conforme métodos de rotina do laboratório clínico do IDPC. O clearance de creatinina foi estimado pela equação CKD-EPI.

3.10. Análise dos polimorfismos:

Para esse estudo foram analisados polimorfismos genéticos relacionados com a predisposição ao desenvolvimento de hipertensão arterial, como os *SNP rs1801252* e *rs1801253* do gene *ADBR1* (receptor adrenérgico beta 1); os *SNP rs699* do gene *AGT* (angiotensinogênio); e o *SNP rs2297518* do gene *NOS2* (óxido nítrico sintase induzível). A escolha desses SNPs foi realizada com base nas informações disponíveis na literatura e nos bancos de dados dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>).

Para a análise dos polimorfismos genéticos, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA e processadas utilizando o kit TaqMan™ Sample-to-SNP™ (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

PCR em Tempo Real

Os polimorfismos listados na tabela 1 foram analisados através da PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR), utilizando o sistema de detecção *TaqMan*®

SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems) e o equipamento RotorGene® (Qiagen). Para cada polimorfismo foram utilizadas duas sondas (cada uma contendo um dos alelos), sendo uma marcada com corante fluorescente FAM® e a outra marcada com VIC®.

Na reação de amplificação, além do DNA estabilizado e dos reagentes do kit *TaqMan® Genotyping MasterMix* (Applied Biosystem), foram adicionados o ensaio *Taqman® SNP Genotyping Assay 1x* (Applied Biosystem), e água livre de DNase em um volume final de 20µL. Para todos os ensaios foram utilizados controles negativos (sem adição de DNA) afim de verificar possíveis contaminações dos reagentes e controles positivos para cada um dos genótipos dos polimorfismos estudados. A qPCR ocorreu nas seguintes condições: um ciclo de 20 seg a 95°C (ativação da enzima Hot Star Taq); 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos a 60°C (hibridização e extensão). Ao final das reações, aproximadamente 10% das amostras foram novamente genotipadas, com o objetivo de validar os resultados. Os dados foram analisados utilizando o programa *Rotor-Gene Q – Pure detection* (Qiagen).

Tabela 1. Relação dos polimorfismos e especificações dos ensaios utilizados na genotipagem pela qPCR.

Gene	Número de Catalogo	Troca	Marcação
<i>NOS2 rs2297518</i>	C__11889257_10	[A / G]	[VIC/ FAM]
<i>AGT rs699</i>	C__1985481_20	[A / G]	[VIC/ FAM]
<i>ADBR1 rs1801252</i>	C__8898508_10	[A / G]	[VIC/ FAM]
<i>ADBR1 rs1801253</i>	C__8898494_10	[C / G]	[VIC/ FAM]

Legenda: *ADBR1* – receptor adrenérgico beta 1; *AGT* – angiotensinogênio; *NOS2* – óxido nítrico sintase induzível.

3.11. Método Estatístico:

Os resultados estão apresentados por meio de tabelas e gráficos, utilizando-se da estatística descritiva. Na análise estatística, para dados quantitativos, os resultados estão apresentados por uma medida de tendência central e um indicador da variabilidade dos dados. Utilizamos para os dados numéricos a média como medida de localização e o desvio padrão como medida de dispersão.

Para as variáveis contínuas, as comparações das médias das variáveis contínuas entre os grupos HAR controlada e HAR não controlada foram realizadas

através do teste não-paramétrico Wilcoxon-Mann-Whitney, quando a distribuição da variável não era normal, ou o teste F, quando a distribuição era tida como normal.

Quando não se tinha evidências para rejeitar a hipótese de homogeneidade dos grupos, as comparações das médias das variáveis contínuas entre os grupos foram realizadas através do teste t-Student com variâncias iguais. Caso contrário, ou seja, no contexto de heterogeneidade dos grupos, foi realizado o teste t-Student com variâncias diferentes.

Na análise estatística, para dados qualitativos, os resultados estão apresentados por contagens (frequências absolutas) de cada uma das categorias das variáveis de interesse. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar se existiam diferenças nas proporções de cada uma das categorias das variáveis de interesse nos grupos de controlados e não controlados. Para aquelas variáveis em que os testes foram significativos, informamos as razões de chances juntamente com seu intervalo de confiança de 95%.

Além disso, o teste qui-quadrado de Pearson foi utilizado para avaliar se existiam diferenças entre os grupos nas frequências relativas de cada genótipo dos SNPs acima mencionados.

O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) será realizado pela ferramenta disponibilizada em linha pelo Prof. Court, Universidade do Estado de Washington. O HWE indica que, dentro de determinadas condições, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações. Independentemente de um gene ser raro ou frequente, sua frequência permanecerá a mesma com relação aos outros desde que essas condições sejam mantidas.

A construção do banco de dados e das análises estatísticas foram feitas através do Statistical Package for the Social Sciences v. 22.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Nas análises estatísticas, os valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

3.12. Aspectos éticos e legais

O presente estudo (CAAE: 12553219.2.0000.5462) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IDPC em 02 de maio de 2019, conforme parecer número (nº) 3.297.858 (protocolo nº:4947/2019), encontrado no Anexo B.

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais da população

A amostra total de hipertensos resistentes foi constituída de 142 pacientes, incluindo 82 controlados e 60 não controlados, avaliados no período entre junho de 2018 e março de 2019.

A média de idade dos incluídos foi 63,27 anos (± 11), sendo 66% do sexo feminino. A maioria da população era de raça branca, constituindo 75% dos avaliados, enquanto os negros atingiram 24%. O índice de massa corpórea (IMC) médio foi de 30,38 Kg/m² (± 5), sendo que 57% eram diabéticos, 85% dislipidêmicos e 36% tinham história atual ou prévia de tabagismo.

Além disso, a prevalência de doença arterial coronária (DAC) na população era de 25%, enquanto 12% possuíam história de acidente vascular encefálico (AVE) prévio e 6% fibrilação ou flutter atrial. O clearance de creatinina (ClCr) médio dos pacientes foi de 76.56 ml/min/1.73m² (± 21), sendo que 26% possuíam microalbuminúria, 77% apresentavam critérios eletrocardiográficos ou ecocardiográficos de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e 30% desenvolveram retinopatia hipertensiva, conforme avaliação oftalmológica. As características gerais da amostra total estão apresentadas nas Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Características Gerais da População

	Número absoluto	Percentual
Controlados	82	42%
Não controlados	60	58%
Masculino	48	34%
Feminino	94	66%
Branco	107	75%
Negro	34	24%
Diabetes Mellitus	81	57%
Dislipidemia	121	85%

História de Tabagismo	52	36%
DAC	36	25%
AVE	17	12%
Fibrilação Atrial	8	6%
HVE	110	77%
Microalbuminúria	38	26%
Retinopatia	43	30%
	Média	Desvio-padrão
Idade (anos)	63,2	±11,3
IMC (Kg/m²)	30,3	±5,4
ClCr (ml/min/1.73m²)	76,5	±21,8
Nº de anti-hipertensivos	4,6	±0,87
PAS consultório (mmHg)	153	±26
PAD consultório (mmHg)	82	±15

Legenda: DAC: Doença Arterial Coronariana; AVC: Acidente Vascular Cerebral; HVE: Hipertrofia Ventricular Esquerda; IMC: Índice de Massa Corpórea; ClCr: Clearance de Creatinina; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica

O valor médio de PAS no consultório foi de 153 mmHg (± 26), enquanto a PAD média ficou em 82 mmHg (± 15). A quantidade média de anti-hipertensivos em uso foi de 4,69 ($\pm 0,8$), sendo que 97% estavam em uso de diuréticos tiazídicos, 95% recebiam bloqueadores de canal de cálcio (BCC) e 96% usavam inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) ou bloqueadores do receptor de angiotensina (BRA). Espironolactona foi usada em 52% dos indivíduos e 72% faziam uso de beta-bloqueadores. Alfa agonistas centrais, nitratos e hidralazina foram menos prescritos, perfazendo 28%, 11% e 9% respectivamente.

Tabela 3. Distribuição das classes de medicamentos anti-hipertensivos na amostra

Classe	Número absoluto	Percentual
Tiazídicos	138	97,1%

IECA/BRA	137	96,4%
BCC	135	95%
Espironolactona	75	52,8%
Beta-bloqueadores	103	72,5%
Agonistas-Centraís	41	28,8%
Nitratos	16	11,2%
Hidralazina	14	9,8%

Legenda: IECA: Inibidor de Enzima Conversora de Angiotensina; BRA: Bloqueador do Receptor de Angiotensina; BCC: Bloqueador de Canal de Cálcio.

4.2. Características específicas dos grupos

As características específicas de cada grupo, divididas entre os hipertensos resistentes controlados e os não controlados constam na Tabela 4 para variáveis qualitativas e na Tabela 5 para variáveis quantitativas, com seus respectivos *P* valores para comparação entre os grupos.

Das características iniciais, apenas a presença de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e a quantidade de anti-hipertensivos em uso apresentaram diferença estatística significativa, denotando homogeneidade fenotípica entre os grupos do estudo. Não houve diferença quanto a idade, raça, comorbidades e classes de anti-hipertensivos utilizadas entre os controlados e não controlados.

Tabela 4. Características qualitativas iniciais da amostra (HAR controlados X não controlados)

Características Qualitativas	HAR não controlados (n=60)		HAR controlados (n=82)		P-valor
	N	%	N	%	
Gênero, Masculino	40	66,6	54	65,8	1
Raça, Brancos	42	70	65	79,2	0,19
Diabetes Melito	31	51,6	50	60,9	0,30
Dislipidemia	48	80	73	89	0,15

História de Tabagismo	19	31,6	33	40,2	0,29
DAC	16	26,6	20	24,3	0,84
AVE	7	11,6	10	12,1	1
Fibrilação Atrial	4	6,6	4	4,8	0,72
HVE	53	88,3	57	69,5	0,008
Microalbuminúria	20	33,3	18	21,9	0,17
Retinopatia	23	38,3	20	24,3	0,09

Medicamentos	N	%	N	%	P-valor
Tiazídicos	59	98,3	79	96,3	0,63
BCC	59	98,3	76	92,6	0,49
IECA	20	33,3	26	31,7	0,85
BRA	37	61,6	54	65,8	0,52
Espironolactona	37	61,6	38	46,3	0,08
Beta-bloqueador	43	71,6	60	73,1	0,85
Nitratos	8	13,3	8	9,7	0,59

Legenda: HAR: Hipertensão Arterial Resistente; DAC: Doença Arterial Coronariana; AVC: Acidente Vascular Cerebral; HVE: Hipertrofia Ventricular Esquerda; BCC: Bloqueador do Canal de Cálcio; IECA: Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina; BRA: Bloqueador do Receptor da Angiotensina.

Com relação à HVE, 88,3% dos pacientes com HAR não controlada apresentaram esta lesão de órgão alvo, vs. 69,5% dos hipertensos resistentes controlados ($p=0.008$). O *Hazard Ratio (HR)* foi de 0,30 com intervalo de confiança (IC) 95% = [0,10-0,79]. Já quanto ao número de anti-hipertensivos em uso, a média entre os hipertensos resistentes não controlados foi de 4,8 fármacos, enquanto entre aqueles com HAR controlada foi de 4,5 medicações ($p=0,03$). Além disso, o valor médio da PA no consultório atingiu 162x87mmHg entre os resistentes não controlados, enquanto chegou a 145x79mmHg entre os controlados, também atingindo significância estatística (Figura 7).

Tabela 5. Características quantitativas iniciais da amostra (HAR controlados X não controlados)

Características Quantitativas	HAR não controlados (n=60)		HAR controlados (n=82)		P-valor
	Média	DP	Média	DP	
Idade	61,7	11,36	64,3	11,33	0,11
IMC	29,4	5,57	31,04	5,28	0,13
CICr	78,2	19,31	75,3	23,57	0,42
Nº anti-hipertensivos	4,8	0,95	4,5	0,81	0,03
PAS no consultório	162	30,04	145	20,70	0,001
PAD no consultório	87	17,77	79	12,09	0,009

Legenda: HAR: Hipertensão Arterial Resistente; IMC: Índice de Massa Corpórea; CICr: Clearance de Creatinina; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica

Figura 8 – Valores de PA no consultório entre HAR não controlada X HAR controlada

Legenda: PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; HAR: Hipertensão Arterial Resistente

4.3. MAPA

Em concordância com as medidas ambulatoriais, todos os valores da MAPA também apresentaram diferença estatística significativa entre os 2 grupos. Durante a vigília, a média de PA foi de 146x86mmHg entre os não controlados e de 121x71mmHg entre os controlados. Já durante o sono, o valor médio de PA foi de 139x79mmHg considerando os resistentes não controlados e de 113x62mmHg entre aqueles controlados. Por fim, a PA média nas 24hs daqueles com HAR não controlada

foi de 144x84mmHg, enquanto foi de 119x68mmHg naqueles com HAR controlada. (Tabela 6; Figuras 8, 9 e 10)

Tabela 6. Valores da MAPA entre os hipertensos resistentes controlados X não controlados

MAPA	HAR não controlados (n=60)		HAR Controlados (n=82)	
	Média	DP	Média	DP
PAS na vigília *	146	12,5	121	10,2
PAD na vigília *	86	11,9	71	8,1
PAS no sono *	139	13	113	10,4
PAD no sono *	79	11,1	62	7,6
PAS nas 24hs *	144	11,6	119	9,4
PAD nas 24hs *	84	10,7	68	7,1

* P-valor<0,05

Legenda: HAR: Hipertensão Arterial Resistente; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica

Figura 9 – Valores de PA na vigília entre HAR não controlada X HAR controlada

Legenda: PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; HAR: Hipertensão Arterial Resistente

Figura 10 – Valores de PA no sono entre HAR não controlada X HAR controlada

Legenda: PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; HAR: Hipertensão Arterial Resistente

Figura 11 – Valores de PA nas 24hs entre HAR não controlada X HAR controlada

Legenda: PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; HAR: Hipertensão Arterial Resistente

4.4. Polimorfismos Genéticos

Foram analisados polimorfismos nos genes *NOS2*, *ADBR1* e *AGT*. Após a genotipagem, o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi calculado para a população do estudo. De acordo com a tabela 7, a distribuição genotípica da população estudada estava de acordo com as previsões da lei de *Hardy-Weinberg*.

Tabela 7. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos *rs1801252* e *rs1801253* no gene *ADBR1*, polimorfismo *rs2297518* do gene *NOS2* e, *rs699* no gene *AGT* na população do estudo.

Genes	Genótipos			Alelos		p valor* (χ^2)
<i>ADBR1 rs1801252</i> A→G	AA	AG	GG	A	G	
	69% (98)	28% (40)	3% (4)	83% (236)	17% (48)	0,97 (0,001)
<i>ADBR1 rs1801253</i> G→C	GG	GC	CC	G	C	
	8% (11)	42% (60)	50% (71)	29% (82)	71% (202)	0,73 (0,12)
<i>NOS2 rs2297518</i> G→A	GG	GA	AA	G	A	
	78% (111)	20% (28)	2% (3)	88% (250)	12% (34)	0,44 (0,59)
<i>AGT rs699</i> A→G	AA	AG	GG	A	G	
	23% (33)	42% (60)	35% (49)	44% (126)	56% (158)	0,09 (2,95)

Legenda: *Análise do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* usando o teste χ^2 . *ADBR1* – receptor adrenérgico beta 1; *AGT* – angiotensinogênio; *NOS2* – óxido nítrico sintase induzível.

Nota: Número de indivíduos entre parênteses.

As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados entre os grupos controlado e não controlado estão representadas na tabela 8.

Tabela 8. Comparação das frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos *rs1801252* e *rs1801253* no gene *ADBR1*, polimorfismo *rs2297518* do gene *NOS2* e, *rs699* no gene *AGT* entre os grupos controlado e não controlado.

Polimorfismos	Genótipos			Alelos	
<i>ADBR1 rs1801252</i> A→G	AA	AG	GG	AA	AG + GG
C (82)	65,9% (54)	30,5% (25)	3,7 % (3)	65,9% (54)	34,1 % (28)
NC (60)	73,3% (44)	25,0% (15)	1,7% (1)	73,3% (44)	26,7% (16)
	p=0,566*			p= 0,342*	
<i>ADBR1 rs1801253</i> G→C	GG	GC	CC	GG	GC + CC
C (82)	11,0% (9)	37,8% (31)	51,2% (42)	11,0% (9)	89,0% (73)
NC (60)	3,3% (2)	48,3% (29)	48,3% (29)	3,3% (2)	96,7% (58)
	p=0,167*			p= 0,092*	
<i>NOS2 rs2297518</i> G→A	GG	GA	AA	GG	GA + AA
C (82)	78% (64)	19,5% (16)	2,4% (2)	78,0% (64)	22,0 % (18)
NC (60)	78,3% (47)	20,0% (12)	1,7% (1)	78,3% (47)	21,7% (13)
	p= 0,950*			p=0,968*	
<i>AGT rs699</i> A→G	AA	AG	GG	AA	AG + GG
C (82)	23,2% (19)	45,1% (37)	31,7% (26)	23,2% (19)	76,8% (63)
NC (60)	23,3% (14)	38,3% (23)	38,3% (23)	23,3% (14)	76,7% (46)
	p= 0,664*			p=0,982*	

Legenda: *ADBR1* – receptor adrenérgico beta 1; *AGT* – angiotensinogênio; *NOS2* – óxido nítrico sintase induzível. **C**= Controlado; **NC**= Não controlado. * Teste Qui-Quadrado de Pearson. **Nota:** Número de indivíduos entre parênteses.

4.4.1. Gene do receptor adrenérgico Beta 1 (*ADBR1*)

Os polimorfismos genéticos envolvendo o receptor adrenérgico beta 1 (*ADRB1*) não apresentaram diferença estatística significativa com relação à suas prevalências entre os grupos controlados e não controlados.

Os genótipos do polimorfismo *rs1801252* se distribuíram uniformemente entre os 2 grupos (Tabela 8). No grupo dos pacientes com HAR não controlada, 73,3% possuíam o genótipo GG, enquanto 25% apresentavam o genótipo AG e 1,7% o genótipo AA. Já no grupo dos resistentes controlados, 65,9% deles tinham o genótipo GG, 30,5% o genótipo AG e apenas 3,7% o genótipo AA. (p-valor: 0,583)

Ao se analisar as frequências alélicas isoladamente, o alelo A (*Ser*) esteve presente em 83,1% das vezes em nossa amostra, enquanto o alelo G apenas em 16,9%.

Com relação aos genótipos envolvendo o polimorfismo *rs 1801253*, estes também se mostraram semelhantes entre os grupos avaliados (Tabela 8). No grupo dos hipertensos resistentes não controlados, a frequência genotípica CC foi de 48,3%, enquanto o genótipo CG também esteve presente em 48,3% e o genótipo GG per fez

só 3,3% da amostra. Já na população com HAR controlada, 51,2% apresentaram o genótipo CC, 37,8% tinham o genótipo CG e 10,9% possuíam a variação GG. (p-valor: 0,180)

Na análise individual da frequência alélica, o alelo C (*Arg*) teve frequência de 71,1%, enquanto o alelo G (*Gly*) teve prevalência de 28,8%.

4.4.2. Gene do angiotensinogênio (*AGT*)

O polimorfismo *rs699* do gene do angiotensinogênio (*AGT*) não demonstrou diferença significativa entre os resistentes controlados e não controlados (p-valor: 0,659). Nos primeiros, a frequência do genótipo GG foi de 38,3%, enquanto o genótipo AG também se apresentou em 38,3% dos pacientes e o genótipo AA apareceu em 23,3% deste grupo. Já nos últimos, 31,7% possuíam o genótipo GG, 45,1% tinham o genótipo AG e 23,1% o genótipo AA. (Tabela 8)

Quando se analisa individualmente a proporção alélica, a frequência do alelo A (*Met*) foi de 55,6%, enquanto o alelo G (*Thr*) este presente em 44,3% dos locus gênicos.

4.4.3. Gene da óxido nítrico sintase induzível (*NOS2*)

Ademais, o polimorfismo *rs2297518* do gene da óxido nítrico sintase induzível (*NOS2*) também não conseguiu atingir significância estatística na comparação entre os 2 grupos. (p-valor: 0,950) O genótipo GG esteve presente em 78,3% dos hipertensos resistentes não controlados, enquanto o genótipo GA se manifestou em 20% e o genótipo AA em apenas 1,6% deste grupo. Já entre aqueles com HAR controlada, o genótipo GG teve prevalência de 78%, sendo que 19,5% possuíam o genótipo GA e 2,4% o genótipo AA. (Tabela 8)

Ao se analisar isoladamente a frequência alélica, o alelo G teve prevalência de 88%, enquanto o alelo A se fez presente em apenas 11,9% das vezes.

4.4.4. Comportamento dos polimorfismos entre brancos e negros

Diante da grande heterogeneidade étnica encontrada no Brasil, também realizamos a análise do comportamento destes polimorfismos entre a população de brancos e negros separadamente.

Os indivíduos de raça branca contabilizaram 107 pacientes, sendo 42 resistentes não controlados (39,2%) e 65 controlados (60,7%). Já os negros totalizaram 34 pacientes, sendo 18 com HAR não controlada (52,9%) e 16 com HAR controlada (47%), sugerindo uma maior tendência destes em não atingir o controle da pressão arterial quando comparados com os brancos.

Mais uma vez, a frequência das 4 variantes genéticas não atingiu diferença estatística significativa entre os controlados e não controlados, indiferentemente do grupo racial avaliado. (Tabelas 9 e 10)

Tabela 9. Frequência genotípica dos polimorfismos na raça branca

Polimorfismos	Genótipos	HAR não controlados (n=42)	HAR controlados (n=65)	P-valor
		N	N	
ADRB1_rs1801252	AA AG GG	31 10 1	43 20 2	0.783
ADRB1_rs1801253	GG GC CC	1 19 22	6 24 35	0.341
NOS2_rs2297518	GG GA AA	30 11 1	51 13 1	0.682
AGT_rs699	AA AG GG	11 18 13	16 31 18	0.874

Tabela 10. Frequência genotípica dos polimorfismos na raça negra

Polimorfismos	Genótipos	HAR não controlados (n=18)	HAR controlados (n=16)	P-valor
		N	N	
ADRB1_rs1801252	AA AG GG	13 5 0	10 5 1	0.845
ADRB1_rs1801253	GG GC CC	1 10 7	3 7 6	0.559
NOS2_rs2297518	GG GA AA	17 1 0	12 3 1	0.199
AGT_rs699	AA AG GG	3 5 10	3 5 8	1

Legenda: HAR: Hipertensão Arterial Resistente; ADRB1: Receptor Adrenérgico Beta 1; NOS2: Óxido Nítrico Sintase Induzível; AGT: Angiotensinogênio

5. DISCUSSÃO

5.1. População do estudo

A população do presente estudo era de muito alto risco cardiovascular. Quando comparada à população do Rehot (18), maior estudo nacional sobre o tema até o momento, a nossa amostra incluiu pacientes mais idosos (63 x 55 anos) e com maior prevalência de DM (57% x 32%), dislipidemia (85% x 36%), doença arterial coronariana e menor taxa de filtração glomerular (76,5 x 88,9 ml/min/1.73m²). Em ambos os estudos predominou o sexo feminino e houve valores similares de IMC (30,3 x 30,7 Kg/m²), além de taxas semelhantes de AVC prévio (12% x 10%).

Quando se compara o grupo de resistentes controlados com os não controlados, observa-se grande semelhança fenotípica entre eles. Ambos os grupos possuíam idade, IMC e função renal bastante semelhantes, com prevalência de comorbidades também homogênea. Além disso, as classes de anti-hipertensivos se distribuíram uniformemente entre os grupos, o que permite uma comparação genética mais apropriada, com menos influência de fatores ambientais.

Em concordância com a literatura, os pacientes com HAR não controlada apresentaram mais HVE em comparação àqueles com HAR controlada. No artigo original de Martins LC (46), ele comparou 47 hipertensos resistentes não controlados com 43 resistentes controlados, encontrando diferença estatística entre os valores de massa ventricular dos 2 grupos após 1 ano de acompanhamento (179.0 ± 49.2 vs. 140.3 ± 30.1 g/m²).

5.2. Polimorfismos genéticos

5.2.1. Gene do receptor Beta 1 (*ADRB1*)

Já existe interesse de longa data nas variantes genéticas do *ADRB1* (gene que codifica o receptor adrenérgico β1) e no papel delas nas doenças cardiovasculares e na resposta à certos medicamentos. Muitos estudos testaram estes polimorfismos nos mais variados cenários fenotípicos, incluindo no controle da pressão arterial (75) e da frequência cardíaca (76), na cardiomiopatia dilatada (77), no acidente vascular cerebral (78) e em desfechos cardiovasculares compostos. (79)

Os 2 SNPs mais comuns e mais bem estudados do gene ADRB1 são o *rs1801252* (A>G; Ser49Gly) e o *rs1801253* (G>C; Arg389Gly), ambos avaliados em nosso estudo. A associação dos polimorfismos *rs1801252* (Ser49Gly) e *rs1801253* (Arg389Gly) com hipertensão vem sendo investigada exaustivamente, entretanto a literatura tem demonstrado resultados variados.

O projeto “1000 Genomas” é uma colaboração internacional que estabeleceu o catálogo mais detalhado de variações genéticas humanas até hoje, incluindo diversos SNPs. A fase final do projeto sequenciou mais de 2.500 indivíduos de 26 populações diferentes em todo o mundo, sem incluir o Brasil. (74)

Em comparação com a população deste catálogo, ao avaliarmos o polimorfismo *rs1801252*, nossa amostra teve uma frequência de 88% do alelo A (Ser), se aproximando da frequência alélica encontrada na população européia (87,3%) e asiática (86%), porém diferindo um pouco da frequência que este alelo atingiu na população africana (76,1%) e americana mestiça (74,9%). (Figura 12)

Figura 12 – Frequência dos alelos A (Ser) e G (Gly) no mundo e na população estudada

Legenda: AFR: Africa; AMR: America; EAS: Sudeste asiático; EUR: Europa; SAS: Sul asiático; IDPC: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Levando-se em conta as frequências genotípicas do polimorfismo *rs1801252*, o nosso estudo não mostrou diferença estatística significativa entre os resistentes controlados e não controlados. Apesar da heterogeneidade de dados na literatura, tal achado vai de encontro com as últimas metanálises publicadas sobre o assunto (75,80), que demonstraram aumento de 19% na chance de desenvolver HAS nos portadores do alelo 49Gly (genótipo GG ou GA) em comparação com os indivíduos homocigóticos para o alelo 49Ser (genótipo AA).

Quando comparamos as frequências alélicas envolvendo o polimorfismo rs1801253 com as encontradas no projeto “1000 Genomas”, notamos novamente que a prevalência do alelo C (*Arg*) no nosso estudo (71,1%) se assemelha à dos europeus (68,5%) e dos sul asiáticos (73,4%), porém com certa divergência em relação aos africanos (57%) e americanos mestiços (80,5%). (Figura 13)

Figura 13 – Frequência dos alelos C (*Arg*) e G (*Gly*) no mundo e na população estudada

Legenda: AFR: Africa; AMR: America; EAS: Sudeste asiático; EUR: Europa; SAS: Sul asiático; IDPC: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

O polimorfismo rs 1801253 também não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos. Este dado também difere das metanálises acerca do tema, que demonstraram uma chance 16% menor de hipertensão naqueles com o alelo selvagem G (genótipos GG e CG), quando comparados com o genótipo CC em homozigose. (75,80,81)

Entretanto, quando realizamos a comparação através do modelo alélico (GG vs GC + CC), houve uma maior tendência de controle da pressão arterial naqueles pacientes com o alelo G em homozigose, porém ainda sem significância estatística. (p= 0,092).

Kong H. et al, na avaliação de subgrupos da sua metanálise acerca destes 2 SNPs (rs 1801252 e rs 1801253), mostrou que só se atingiu significância estatística quando se incluíram os estudos com amostra superior a 500 pacientes. (75) Desta forma, talvez pudéssemos alcançar valor estatístico mais significativo, caso o tamanho amostral do nosso estudo fosse maior.

Ressalta-se ainda que, diferentemente dos estudos prévios que avaliaram estes polimorfismos, nossa amostra incluiu apenas hipertensos resistentes, o que pode explicar em parte a diferença em relação às pesquisas anteriores.

5.2.2. Gene do angiotensinogênio (AGT)

Já é bem estabelecido na literatura que o hiperaldosteronismo é uma das causas de hipertensão resistente ao tratamento. O angiotensinogênio sabidamente é um dos componentes envolvidos no sistema renina-angiotensina-aldosterona, o que o torna um importante regulador da pressão arterial. Embora as variantes genéticas do *AGT* estejam entre as mais estudadas no contexto de hipertensão e doença cardiovascular, as associações encontradas não são consistentes na literatura.

No nosso estudo, as frequências alélicas do polimorfismo rs699, correspondente ao gene *AGT*, se assemelheram com a encontrada na população europeia, assim como no gene *ADRB1*. No projeto “1000 Genomas”, o alelo A (*Met*) esteve presente em 58,8% dos europeus, enquanto o alelo G (*Thr*) teve prevalência de 41,2%. Enquanto isso, nós encontramos uma frequência de 55,6% para o alelo A (*Met*) e de 44,3% para o alelo G (*Thr*). Mais uma vez tais números diferem bastante dos encontrados na população africana (alelo A: 9,7% / alelo G: 90,3%) e dos americanos mestiços (alelo A: 36,5% / alelo G: 63,5%). (Figura 14).

Figura 14 – Frequência dos alelos A (*Met*) e G (*Thr*) no mundo e na população estudada

Legenda: AFR: Africa; AMR: America; EAS: Sudeste asiático; EUR: Europa; SAS: Sul asiático; IDPC: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Na análise genotípica do polimorfismo rs699 também não encontramos diferença estatística significativa entre os hipertensos resistentes controlados e não controlados, o que difere do encontrado previamente na literatura.

Yugar-Toledo et al., em seu pequeno estudo no Brasil, comparou hipertensos resistentes, com hipertensos controlados e normotensos, demonstrando que os pacientes que possuíam o alelo G (*Thr*) possuíam maior risco de HAR, particularmente naqueles com idade acima de 50 anos. (64)

Já Lynch et al. avaliou a associação de 78 polimorfismos genéticos entre 2203 participantes com HAR e 2354 controles no estudo GenHAT. (63) Na população de americanos com descendência africana nenhum marcador genético atingiu significância, porém o polimorfismo rs699 foi associado com HAR entre os caucasianos. O alelo selvagem A (*Met*) foi associado com aumento do risco de resistência ao tratamento nessa população: HR=1.27 (1.12-1.44, P=0.0001)

Entretanto, mais uma vez nenhum dos estudos acima comparou apenas os hipertensos resistentes controlados com aqueles não controlados, o que pode ter interferido na diferença dos resultados encontrados. Ademais, tal comparação é muito difícil de ser realizada na medida em que a população brasileira possui um alto grau de miscigenação étnica, incluindo ancestralidade africana, europeia e ameríndia.

5.2.3. Gene da óxido nítrico sintase 2 (NOS2)

O papel da inflamação vascular e da disfunção endotelial no desenvolvimento da HAR tem encorajado a investigação de polimorfismos envolvidos na função vascular. (82) O óxido nítrico (NO) tem sido um foco da pesquisa em hipertensão devido ao seu efeito na regulação da PA através da atividade dos fatores relaxantes derivados do endotélio. (31) Adicionalmente, a depleção do óxido nítrico está implicada na patogênese da hipertensão. (83)

O NO é produzido pela NO sintase (NOS), que possui três isoformas: NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (NOS2) e NOS endotelial (eNOS). Enquanto nNOS e eNOS são expressas constitucionalmente, a NOS2 é induzida pela inflamação e pelo dano cardíaco. Durante a inflamação, o NO produzido pela NOS2 reage com espécies reativas de oxigênio, dando origem ao peroxinitrito, que por sua vez leva a disfunção vascular. (84)

Nossa avaliação genotípica acerca do polimorfismo *rs2297518* envolvendo o gene *NOS2* mais uma vez não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos avaliados.

Tal resultado é diferente do estudo brasileiro de Oliveira-Paula, et al., que comparou esta variante entre 113 indivíduos normotensos, 115 hipertensos controlados e 82 hipertensos resistentes⁶¹. Naquela população, as variantes genotípicas AA e GA foram mais frequentes nos hipertensos controlados e nos

resistentes em comparação com os normotensos ($HR=2.05$, $p=0.0016$), o que levou a hipótese de que estes genótipos poderiam estar relacionados com hipertensão.

Entretanto, as variantes estudadas eram mais comuns tanto nos hipertensos bem controlados, quanto nos resistentes, o que dificulta qualquer conclusão acerca do papel deste polimorfismo no desenvolvimento de HAR. Dessa forma, esta pode ser uma das razões pela qual este polimorfismo não influenciou no controle pressórico da nossa população, visto que incluímos apenas o subgrupo restrito de hipertensos resistentes.

5.2.4. Considerações finais

Os resultados do presente estudo demonstram que os polimorfismos genéticos do receptor adrenérgico beta 1, da óxido nítrico sintase induzível e do angiotensinogênio não impactaram no controle da pressão arterial da população de hipertensos resistentes avaliada.

A hipertensão resistente é marcada pela heterogeneidade genética e envolve múltiplas vias fisiopatológicas, cada uma delas podendo ser afetada por múltiplos produtos genéticos. Neste sentido, variantes genéticas isoladas podem não exibir associação significativa com hipertensão de difícil controle, visto que seus efeitos tendem a ser afetados pela interação com o ambiente e vários outros genes. Tudo isto faz com que estudos genéticos envolvendo HAR sejam especialmente desafiadores.

Por outro lado, estudos maiores sobre o assunto são essenciais para que possamos entender melhor as vias fisiopatológicas envolvidas na resistência ao tratamento e consigamos ajudar no desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas para estes pacientes.

5.3. Limitações do estudo

A principal limitação deste estudo é o tamanho reduzido da amostra, o que pode ter comprometido a força de associação entre os polimorfismos e o controle da pressão arterial. Atualmente já existe boa evidência científica de que, aumentando-se o tamanho da amostra, há uma melhora significativa na capacidade de se detectar uma associação entre variantes comuns e doenças complexas (85), como é o caso da hipertensão resistente.

Além disso, trata-se de estudo unicêntrico, apenas em população de origem brasileira, não sendo possível extrapolar seus resultados para outros grupos étnicos.

Por fim, alguns dados foram pesquisados através de coleta de dados em prontuário, além de que a avaliação da aderência medicamentosa foi feita somente por meio de questionário, o que pode ter levado a vieses de aferição.

6. CONCLUSÃO

As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos envolvendo os genes *ADRB1*, *AGT* e *NOS2* não diferiram entre os hipertensos resistentes com bom controle pressórico e aqueles com controle inadequado, sugerindo que estas variantes não tenham grande impacto na refratariedade ao tratamento deste restrito grupo de pacientes.

Apesar disso, ao se avaliar o polimorfismo rs1801253 do gene *ADRB1* através do modelo alélico, houve tendência de maior controle da PA naqueles pacientes com o alelo G em homozigose, o que mostra a necessidade de estudos maiores a fim de que possamos entender melhor a magnitude da influência de fatores genéticos nesta população.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Ettehad D, Emdin CA, Kiran A, et al. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2016;387:957–967.
2. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual bloodpressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360(9349):1903-13.
3. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A. Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension. Overview, meta-analyses, and metaregression analyses of randomized trials. *J Hypertens*. 2014;32:2285–2295.
4. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Departamento de Hipertensão Arterial. VII Diretrizes brasileiras de hipertensão. *Rev Bras Hipertens*. 2016;17(1):4-62.
5. Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, et al. PURE Study Investigators. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA*. 2013;310:959–968.
6. NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *Lancet*. 2017;389:37–55.
7. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005;365:217–223.
8. Page IH: Hypertension Mechanisms. Orlando, FL: Grune and Stratton, 1987
9. Alessi A, Brandão AA, Coca A, Cordeiro AC, Nogueira AR, Diógenes de Magalhães F, et al. First Brazilian position on resistant hypertension. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99(1):576-85.
10. Freis ED. Historical development of antihypertensive treatment. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 2741–51.
11. Hakkila J. Use of oxaditon in cases of reserpine-resistant hypertension. *Ann Med Intern Fenn*. 1958;47(3):137–46.
12. Gifford RW Jr, Tarazi RC. Resistant hypertension: diagnosis and management. *Ann Intern Med*. 1978;88(5):661–5.

13. 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. *Hypertension*. 2008;51(6):1403-19.
14. Acelajado MC, Pisoni R, Dudenbostel T, Dell'Italia LJ, Cartmill F, Zhang B, Cofield SS, Oparil S, Calhoun DA. Refractory hypertension: definition, prevalence, and patient characteristics. *J Clin Hypertens*. 2012;14:7–12.
15. Irvin MR, Booth JN 3rd, Shimbo D, et al. Apparent treatment resistant hypertension and risk for stroke, coronary heart disease, and all-cause mortality. *J Am Soc Hypertens*. 2014;8(6):405–13.
16. Muntner P, Davis BR, Cushman WC, et al. Treatment-resistant hypertension and the incidence of cardiovascular disease and end stage renal disease: results from the Antihypertensive and LipidLowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Hypertension*. 2014;64(5):1012–21.
17. Sim JJ, Bhandari SK, Shi J, et al. Comparative risk of renal, cardiovascular, and mortality outcomes in controlled, uncontrolled resistant, and nonresistant hypertension. *Kidney Int*. 2015;88:622–32.
18. Krieger EM, Drager LF, Giorgi DM, Krieger JE, Pereira AC, Barreto-Filho JA, et al; ReHOT Investigators. Resistant hypertension optimal treatment trial: a randomized controlled trial. *Hypertension*. 2018;71(4):681-690
19. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120:1640–1645.
20. 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(5):811-7
21. Dudenbostel T, Siddiqui M, Oparil S, Calhoun DA. Refractory hypertension: a novel phenotype of antihypertensive treatment failure. *Hypertension*. 2016;67(6):1085–92.
22. Hwang AY, Dietrich E, Pepine CJ, et al. Resistant Hypertension: Mechanisms and Treatment. *Curr Hypertens Rep*. 2017;19:56.
23. Feng W, Dell'Italia LJ, Sanders PW. Novel paradigms of salt and hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(5):1362–9.

24. Taler SJ, Textor SC, Augustine JE. Resistant hypertension: comparing hemodynamic management to specialist care. *Hypertension*. 2002;39(5):982–8.
25. Garg JP, Elliott WJ, Folker A, Izhar M, Black HR. Resistant hypertension revisited: a comparison of two university-based cohorts. *Am J Hypertens*. 2005;18:619–26.
26. Vlase HL, Panagopoulos G, Michelis MF. Effectiveness of furosemide in uncontrolled hypertension in the elderly: role of renin profiling. *Am J Hypertens*. 2003;16(3):187–93.
27. Gaddam KK, Nishizaka MK, Pratt-Ubunama MN, et al. Characterization of resistant hypertension: association between resistant hypertension, aldosterone, and persistent intravascular volume expansion. *Arch Intern med*. 2008;168(11):1159–64.
28. Te Riet L, van Esch JH, Roks AJ, van den Meiracker AH, Danser AH. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circ Res*. 2015;116(6):960–75.
29. Shimosawa T. Salt, the renin-angiotensin-aldosterone system and resistant hypertension. *Hypertens Res*. 2013;36(8):657–60.
30. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829–37.
31. Yugar-Toledo JC, Martin JF, Krieger JE, 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(8):555–64.
32. Judd EK, Calhoun DA, Warnock DG. Pathophysiology and treatment of resistant hypertension: the role of aldosterone and amiloride-sensitive sodium channels. *Semin Nephrol*. 2014;34(5): 532–9.
33. Takahashi H. Upregulation of the renin-angiotensin-aldosterone-ouabain system in the brain is the core mechanism in the genesis of all types of hypertension. *Int J Hypertens*. 2012;2012:242786.
34. Grassi G, Mark A, Esler M. The sympathetic nervous system alterations in human hypertension. *Circ res*. 2015;116(6):976–90.
35. Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2003;108(5):560-5.
36. Katholi RE. Renal nerves in the pathogenesis of hypertension in experimental animals and humans. *Am J Physiol*. 1983;245(1):1-14.

37. Salles GF, Ribeiro FM, Guimaraes GM, Muxfeldt ES, Cardoso CR. A reduced heart rate variability is independently associated with a blunted nocturnal blood pressure fall in patients with resistant hypertension. *J Hypertens.* 2014;32(3):644–51.
38. Dudenbostel T, Acelajado MC, Pisoni R, Li P, Oparil S, Calhoun DA. Refractory hypertension: evidence of heightened sympathetic activity as a cause of antihypertensive treatment failure. *Hypertension.* 2015;66(1):126–33.
39. Weber MA, et al. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *J Hypertens.* 2014;32(1):14-26.
40. 2018 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal.* 2018;39:3021-3104.
41. Rimoldi SF, Scherrer U, Messerli FH. Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? *Eur Heart J.* 2014;35(19):1245–54.
42. Ernst ME, Moser M. Use of diuretics in patients with hypertension. *N Engl J med.* 2009;361(22):2153–64.
43. Williams B, MacDonald TM, Morant S, et al. Spironolactone versus placebo, bisoprolol, and doxazosin to determine the optimal treatment for drug-resistant hypertension (PATHWAY-2): a randomised, double-blind, crossover trial. *Lancet.* 2015;386:2059–68.
44. Krause T, Lovibond K, Caulfield M, McCormack T, Williams B. Management of hypertension: summary of NICE guidance. *BMJ.* 2011;343:4891.
45. Bhatt DL, Kandzari DE, O'Neill WW, et al. A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *N Engl J Med.* 2014;370:1393-1401.
46. Martins LC, et al. Characteristics of resistant hypertension: ageing, body mass index, hyperaldosteronism, cardiac hypertrophy and vascular stiffness. *J Hum Hypertens.* 2011;25(9):532–8.
47. Yugar-Toledo JC, Brunelli V, Vilela-Martin JF, et al. Controlled Versus Uncontrolled Resistant Hypertension: Are They in the Same Bag? *Curr Hypertens Rep* (2018) 20:26.
48. El Rouby N, Cooper-DeHoff RM. Genetic of resistant hypertension: a novel pharmacogenomic phenotype. *Curr. Hypertens.* 2015;17(9):583.
49. Dumitrescu L, Ritchie MD, Denny JC, El Rouby NM, McDonough CW, Bradford Y, et al. Genome-wide study of resistant hypertension identified from electronic health records. *PLoS One.* 2017;12:e0171745.

50. Gibson & Muse. A Primer of Genome Science, 2nd Edition. Sinauer Associates. 2004
51. Strachan T, Read A. Genética Molecular humana. 4ª edição. São Paulo: Artmed, 2016.
52. Ahles A, Engelhardt S. Polymorphic variants of adrenoceptors: pharmacology, physiology, and role in disease. *Pharmacol Rev.* 2014;66:598–637.
53. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Trendelenburg U. International Union of Pharmacology nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacological Reviews.* 1994;6(2):121-136
54. Dorn GW. Adrenergic Signaling Polymorphisms and Their Impact on Cardiovascular Disease. II *Physiological Reviews.* 2010;90(3):1013-1062
55. Maqbool A, et al. Common polymorphisms of β_1 -adrenoceptor: identification and rapid screening assay. *The Lancet.* 1999;353(9156):897.
56. Tikhonoff V, et al. Blood pressure and metabolic phenotypes in relation to the ADRB1 Arg389Gly and ADRA2B I/D polymorphisms in a White population. *J Hum Hypertens.* 2008;22(12):864-7.
57. Gjesing AP, Andersen G, Albrechtsen A, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O. Studies of associations between the Arg389Gly polymorphism of the beta1-adrenergic receptor gene (ADRB1) and hypertension and obesity in 7677 Danish white subjects. *Diabet Med.* 2007;24(4):392-7.
58. Johnson AD, et al. Association of hypertension drug target genes with blood pressure and hypertension in 86,588 individuals. *Hypertension.* 2011;57:903–910.
59. Sofowora GG, et al. A common beta1-adrenergic receptor polymorphism (Arg389Gly) affects blood pressure response to beta-blockade. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73:366-371.
60. Cruz-Gonzalez, et al. Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study. *BMC Cardiovascular Disorder.* 2009;9(1):35.
61. Oliveira-Paula GH, et al. Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with hypertension and responsiveness to antihypertensive drug therapy. *Gene.* 2013;515(2):391-5
62. Fontana V, et al. Modulation of aldosterone levels by -344 C/T CYP11B2 polymorphism and spironolactone use in resistant hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2014;8(3):146-51.

63. Lynch AI, Irvin MR, Davis BR, et al. Genetic and Adverse Health Outcome Associations with Treatment Resistant Hypertension in GenHAT. *Int J Hypertens*. 2013; 2013:578578.
64. Yugar-Toledo JC, Martin JFV, Krieger JE, et al. Gene variation in resistant hypertension: multilocus analysis of the angiotensin 1-converting enzyme, angiotensinogen, and endothelial nitric oxide synthase genes. *DNA and Cell Biology*. 2011;30(8):555–564.
65. Cooper-DeHoff RM, Johnson JA. Hypertension pharmacogenomics: in search of personalized treatment approaches. *Nat. Rev. Nephrol*. 2016;12(2):110-122.
66. McDonough CW, et al. Pharmacogenomic Association of Nonsynonymous SNPs in *SIGLEC12*, *A1BG*, and the Selectin Region and Cardiovascular Outcomes. *Hypertension*. 2013;62:48-54.
67. Ritter AM, de Faria AP, Fontana V, Modolo R, Moreno H. Does Renal Denervation Fit All Resistant Hypertension? The Role of Genetics. *J Clin Hypertens*. 2016;18(2):161-2.
68. Morisky DE, Green LW, Levine DM. Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence. *Med Care*. 1986;24(1):67-74.
69. Nobre F, Mion Jr. D, Gomes MAM, Barbosa ECD, Rodrigues CIS, Neves MFT et al. 6ª Diretrizes de Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial e 4ª Diretrizes de Monitorização Residencial da Pressão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2018; 110:1-29.
70. Kikuya M, Hansen TW, Thijs L, Björklund-Bodegård K, Kuznetsova T, Ohkubo T, et al. Diagnostic thresholds for ambulatory blood pressure monitoring based on 10-year cardiovascular risk. *Circulation*. 2007;115(16):2145-52.
71. Ugajin T, Hozawa A, Ohkubo T, Asayama K, Kikuya M, Obara T, et al. Whitecoat hypertension as a risk factor for the development of home hypertension: the Ohasama study. *Arch Intern Med*. 2005;165(13):1541-6.
72. Pickering TG, White WB, American Society of Hypertension Writing Group. ASH Position Paper: Home and ambulatory blood pressure monitoring. When and how to use self (home) and ambulatory blood pressure monitoring. *J Clin Hypertens*. 2008;10(11):850-5.
73. O'Brien E, Parati G, Stergiou G, Asmar R, Beilin L, Bilo G, et al. European Society of Hypertension position paper on ambulatory blood pressure monitoring. *J Hypertens*. 2013;31(9):1731-68.
74. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526:68-74.

75. Kong H, Li X, Zhang S, Guo S, Niu W. The β 1-adrenoreceptor gene Arg389Gly and Ser49Gly polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2013;40:4047–4053.
76. Wilk JB, Myers RH, Pankow JS, Hunt SC, Leppert MF, Freedman BI, et al. Adrenergic receptor polymorphisms associated with resting heart rate: the HyperGEN Study. *Ann Hum Genet.* 2006;70:566–573.
77. Forleo C, Sorrentino S, Guida P, Romito R, De Tommasi E, Iacoviello M, et al. Beta1- and beta2-adrenergic receptor polymorphisms affect susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med.* 2007;8:589-595.
78. Magvanjav O, McDonough CW, Gong Y, et al. Pharmacogenetic Associations of β 1-Adrenergic Receptor Polymorphisms With Cardiovascular Outcomes in the SPS3 Trial. *Stroke.* 2017;48(5):1337-1343.
79. Pacanowski MA, Gong Y, Cooper-Dehoff RM, Schork NJ, Shriver MD, Langaee TY, et al.; INVEST Investigators. beta-adrenergic receptor gene polymorphisms and beta-blocker treatment outcomes in hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;84:715-721.
80. Kitsios GD, Zintzaras E. Synopsis and Data Synthesis of Genetic Association Studies in Hypertension for the Adrenergic Receptor Family Genes: The CUMAGAS-HYPERT Database. *Am J Hypertens.* 2010;23(3):305-13.
81. Li YJ, Li N, Yang L, Li YW, Ding X, Zhao HT, Li Y. Polymorphisms of Arg389Gly of β 1-adrenergic receptor gene and essential hypertension risk: a meta analysis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2011;91(44):3115-9.
82. Barbaro NR, Fontana V, Modolo R, De Faria AP, Sabbatini AR, Fonseca FH, Anhê GF, Moreno H. Increased arterial stiffness in resistant hypertension is associated with inflammatory biomarkers. *Blood Press.* 2015;24(1):7-13.
83. Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2012;14(4):198–205.
84. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):2479–88.
85. Teixeira SK, Pereira AC, & Krieger JE. (2018). Genetics of Resistant Hypertension: the Missing Heritability and Opportunities. *Current Hypertension Reports.* 2018;20(6):48.

8. ANEXOS

Anexo A – Modelo do TCLE aprovado pelo CEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: Estudo de polimorfismos genéticos em portadores de hipertensão arterial resistente controlada e não controlada

Número do Participante da Pesquisa: _____

Iniciais do Participante da Pesquisa: _____

1) INTRODUÇÃO

Antes de concordar em participar deste estudo é importante que você leia e entenda as explicações a seguir. O Comitê de Ética em Pesquisa deste hospital revisou os objetivos e a condução proposta para o estudo, tendo sido aprovado e recebeu parecer favorável a sua realização.

2) CONVITE

Convido(amos) o (a) Sr (a) _____ para participar da pesquisa intitulada “Estudo de polimorfismos genéticos em portadores de hipertensão arterial resistente controlada e não controlada” **desenvolvida pelo Sr Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti.**

3) FINALIDADE

Este estudo tem como objetivo avaliar, dentre os hipertensos de difícil controle, se há alguma alteração genética que seja mais prevalente na população que não consegue

controlar a pressão arterial, em comparação com aqueles bem controlados. Portanto, seríamos capazes de selecionar aqueles com maior chance de resposta ao tratamento medicamentoso.

Para tanto, será feita entrevista completa com os pacientes, além de exame físico e análise do MAPA de 24hs. Por fim, iremos realizar coleta de sangue, através da qual será feita a análise genética para comparação entre os grupos de hipertensos controlados e os não controlados

Para ser incluído na pesquisa o paciente precisa ser maior que 18 anos e estar em uso de pelo menos 4 medicações anti-hipertensivas, sendo uma delas preferencialmente um diurético. Não poderão participar do estudo aqueles com Hipertensão de causa secundária, como por exemplo os que possuem doenças hormonais que levam ao aumento da pressão, além daqueles usuários crônicos de medicações que elevam os níveis pressóricos, aqueles com baixo funcionamento dos rins, com disfunção grave do coração e, ainda, os que não usam os medicamentos da pressão corretamente.

4) DURAÇÃO ESPERADA PARA A PARTICIPAÇÃO

O estudo terá início no momento da assinatura deste termo e não será necessário acompanhamento posterior. O Sr(a) participará conforme descrito no item Procedimentos a seguir.

5) PROCEDIMENTOS

Se o sr. (a) concordar em participar será orientado sobre todos os exames laboratoriais a que será submetido. Todos os pacientes serão convocados a comparecer na seção de Hipertensão Arterial e Nefrologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia em datas previamente agendadas.

O Sr.(a) será submetido a exames laboratoriais, que serão realizados conforme a rotina da instituição, não havendo riscos adicionais em sua realização. Têm por finalidade avaliar perfil metabólico, distúrbios eletrolíticos, descartar causas secundárias de hipertensão arterial e avaliar a presença de alterações genéticas envolvidos no controle da pressão arterial.

Sua participação neste estudo é voluntária, sigilosa, não remunerada e o senhor (a) pode abandoná-lo a qualquer momento sem prejuízo em seu tratamento.

6) RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO:

Caso tenhamos algum resultado relevante com o estudo, o tratamento de sua pressão arterial poderá ser otimizado com benefícios futuros, como melhora do controle pressórico e menor número de medicamentos necessários para controlar a PA. Os riscos envolvidos com a pesquisa são mínimos e estão relacionados com algum possível acidente durante a coleta de sangue.

7) SUAS RESPONSABILIDADES

Em caso de apresentar queda acentuada da pressão, associada a sensação de desmaio, ou aumento excessivo dos níveis pressóricos após mudança de alguma medicação, você deverá contatar o médico do estudo imediatamente. O médico perguntará o que você está sentindo e agendará uma visita. Se você decidir interromper a medicação, será pedido que você retorne para uma visita e que faça os procedimentos explicados acima para a Visita de Final de Tratamento, para sua própria segurança.

8) CONTATO EM CASO DE EMERGÊNCIA/CONTATO COM O CEP

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O pesquisador do estudo Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti poderá ser encontrado no endereço Avenida Dr. Dante Pazzanese, 500 – Ambulatório de Hipertensão – CEP 04012-180 – São Paulo – SP – Telefone 11 5085-6089

Se você tiver alguma dúvida sobre a **ética da pesquisa**, entre em contato com o CEP – Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 – Prédio I – CEP 04012-909 – Telefone 11 5085-6040. O CEP é um grupo formado por profissionais capacitados que fazem a revisão ética inicial e contínua do estudo de pesquisa para manter sua segurança e proteger seus direitos.

Se você procurar por atendimento emergencial em outro hospital ou se for necessária internação, avise o médico que você faz parte de um estudo de pesquisa realizado pelo Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

9) PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA/DESCONTINUAÇÃO

Você pode optar por não participar por qualquer razão sem penalidade ou perda dos benefícios aos quais tem direito e sem qualquer efeito sobre seu tratamento futuro. O médico

pode interromper a medicação pelas seguintes razões: se o tratamento aparentar ser prejudicial a você ou se você não seguir as instruções.

Você tem garantida a liberdade de recusar sua participação ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização.

Tem assegurado o anonimato e a privacidade durante a realização da pesquisa.

As despesas decorrentes de sua participação na pesquisa e do seu acompanhante, como por exemplo alimentação e transporte, serão ressarcidas pelo pesquisador. Em caso de danos eventuais decorrentes comprovadamente da pesquisa o Sr.(a) também será assistido pelo pesquisador integralmente e gratuitamente.

10) DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Fui informado (a) de todos os detalhes relacionados com os efeitos conhecidos e imprevisíveis, efeitos colaterais e riscos.

Fui esclarecido (a) sobre meu direito a tratamento e as terapias alternativas que será mantido.

Ao assinar este termo de consentimento de forma voluntária não estarei abrindo mão de meus direitos legais.

Recebi uma via rubricada e assinada em todas as páginas deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Li e entendi as informações apresentadas nesse Termo de Consentimento Livre e Esclarecidas. Pude fazer perguntas e todas minhas dúvidas foram esclarecidas.

Nome Paciente: _____ (letra de forma)

DATA: __/__/__

Assinatura do Paciente

Nome da Testemunha: _____ (letra de forma)

_____ DATA __/__/__

Assinatura da Testemunha

Nome do Pesquisador: _____

_____ DATA __/__/__

Assinatura do Pesquisador

Anexo B – Aprovação do projeto pelo CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de polimorfismos genéticos em portadores de hipertensão arterial resistente controlada e não controlada

Pesquisador: Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 12553219.2.0000.5462

Instituição Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.297.858

Apresentação do Projeto:

Nº DO PROTOCOLO DO CEP:4947/2019

Nº DE PARTICIPANTES DA PESQUISA:200

Duração do estudo:03/04/2019 à 01/05/2019

Orientador: Prof. Dr. Flavio Antônio de Oliveira Borelli.

Trata-se de estudo observacional, de caráter transversal, unicêntrico, realizado através de pesquisa genética em uma população de pacientes atendidos em ambulatório especializado.

Os pacientes do estudo serão selecionados após realização da monitorização ambulatorial de pressão arterial de 24 horas (M.A.P.A.) no ambulatório de Hipertensão do IDPC.

A partir da análise do exame, serão selecionados os indivíduos que se encaixam na

definição de HAR e avaliados os níveis pressóricos e a aderência ao tratamento (medicações e horários das tomadas preenchidos de forma adequada no relatório do exame).

Todos serão orientados quanto à natureza do trabalho e aqueles que preencherem os critérios de inclusão do estudo e aceitarem participar do projeto (assinando o TCLE) serão submetidos à anamnese detalhada, incluindo a verificação das classes de anti-hipertensivos em uso e a aplicação

do teste de Morisky-Grenn (Anexo II) para avaliação de aderência medicamentosa.

Adicionalmente, será realizado exame físico completo, incluindo medida padronizada da pressão arterial, seguindo a recomendação das últimas diretrizes brasileiras, além de coleta de sangue no laboratório de análises clínicas do IDPC para pesquisa dos polimorfismos genéticos propostos e outros exames bioquímicos de interesse.

Após análise dos dados, será realizada comparação entre a frequência alélica dos polimorfismos encontrada no subgrupo de hipertensos resistentes não controlados e a frequência observada no subgrupo dos não controlados.

Além disso, avaliaremos se existe associação dos polimorfismos com resposta às diferentes classes de fármacos anti-hipertensivos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a associação entre o controle da pressão arterial e a presença dos polimorfismos rs1801252 e rs1801253 do gene ADBR1, rs699 e rs5051 do gene AGT, rs1799998 do gene CYP11B2, rs2297518 do gene NOS2 e rs41322052 do gene NOS3 em pacientes com hipertensão arterial resistente.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a frequência dos polimorfismos rs1801252, rs1801253, rs699, rs5051, rs1799998, rs2297518 e rs41322052 em pacientes com hipertensão arterial resistente controlada e não controlada;
- Avaliar a associação entre os polimorfismos supracitados e a resposta ao tratamento com determinados fármacos anti-hipertensivos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

- Riscos mínimos inerentes a acidentes com material biológico durante coleta de exames laboratoriais.

Benefícios:

- Maior compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na Hipertensão Arterial Resistente;
- Melhora do controle pressórico com menor número de medicamentos;
- Redução de complicações relacionadas a hipertensão arterial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou os termos solicitados

Recomendações:

Informar imediatamente: Relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido.

Comunicar qualquer alteração no projeto e/ou no TCLE através de emenda.

Elaborar e enviar via Plataforma Brasil ao CEP relatórios: Semestrais sobre o andamento da pesquisa e o Relatório Final do Estudo

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012, resolução 510/96 e da Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, em reunião ordinária de 30/04/2019 manifesta-se pela aprovação do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1328008.pdf	25/04/2019 10:55:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado.docx	25/04/2019 10:54:34	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Outros	formaderecrutamento.pdf	17/04/2019 18:35:31	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Folha de Rosto	Scan.pdf	16/04/2019 14:43:51	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Orçamento	orcamentomestrado.pdf	05/04/2019 15:01:36	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Outros	declaracaoriscosbeneficios.pdf	03/04/2019 19:22:23	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Outros	declaracaoderesponsabilidade.pdf	03/04/2019 19:21:39	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	materialbiologico.pdf	03/04/2019 19:20:14	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Outros	listaparticipantes.pdf	03/04/2019 16:44:46	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisador.pdf	03/04/2019 16:41:49	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Outros	declaracaomestrado.pdf	03/04/2019 16:40:37	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Outros	declaracaolattes.pdf	03/04/2019 16:38:35	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Outros	declaracaoestudo.pdf	03/04/2019 16:37:54	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	03/04/2019 16:17:01	Luiz Henrique da Silveira Cavalcanti	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 02 de Maio de 2019

Assinado por:

Pedro Silvio Farsky
(Coordenador)

9. APÊNDICES

Apêndice A – Questionário de aderência elaborado por Morisky-Grenn

ITENS	PONTUAÇÃO	
1. Alguma vez você se esqueceu de tomar os medicamentos para sua doença?	Sim (0)	Não (1)
2. Alguma vez você foi descuidado com os horários de tomar os medicamento?	Sim (0)	Não (1)
3. Alguma vez você deixou de tomar os medicamentos para a sua doença, por se sentir melhor?	Sim (0)	Não (1)
4. Alguma vez você deixou de tomar os medicamentos para a sua doença, por iniciativa própria, após ter se sentido pior?	Sim (0)	Não (1)
Na ocorrência de pelo menos uma resposta sim, aplicar as duas questões seguintes.		
	Motivação	Conhecimento
5. Você foi informado sobre a importância e benefício de usar o medicamento?	—	Sim/não
6. Você se esquece de repor os medicamentos antes que terminem?	Sim/não	—

Escore: 0 a 1 = baixa adesão; 2 a 3 = média adesão; 4 pontos = alta adesão

*Adaptado de MORISKY et al.⁽²⁸⁾