

Sérgio Augusto Bueno Brandão

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS DA TERAPIA ANTI-
HIPERTENSIVA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para Obtenção
do título de Doutor em Ciências

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Sérgio Augusto Bueno Brandão

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS DA TERAPIA ANTI-
HIPERTENSIVA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para Obtenção
do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca

Co-orientador: Dra. Maria Cristina de Oliveira Izar

São Paulo

2009

Brandão, Sergio Augusto Bueno

Efeitos bioquímicos e imunológicos da terapia anti-hipertensiva/ Sergio Augusto Bueno Brandão. -- São Paulo, UNIFESP, 2009.

xx, 64f

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Cardiologia, 2009.

Título em Inglês: Biochemical and immunological effects of antihypertensive therapy

1. Hipertensão. 2. LDL. 3. Anticorpos. 4. Endotélio. 5. Tratamento.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Chefe do Departamento de Medicina: Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola

Chefe da Disciplina de Cardiologia: Prof. Dr. Antonio Carlos Camargo de Carvalho

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof. Dr. Valdir Ambrósio Moisés

Sérgio Augusto Bueno Brandão

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS DA TERAPIA ANTI-
HIPERTENSIVA**

Presidente da banca: Prof. Dr. _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Aprovada em: ____/____/____

DEDICATÓRIAS

À minha querida esposa Eliana, que sempre representou o lírio no pântano de minha alma, pela sua dedicação, esforço e exemplo de luta, orientação e enfrentamento, pelo seu espírito maduro voltado aos nossos ideais de crescimento humano e espiritual. Parafraseando Victor Hugo lhe digo : O homem é a mais elevada das criaturas. A mulher o mais sublime dos ideais. Deus fez para o homem um trono, para a mulher um altar. O trono exalta, o altar santifica. Enfim, o homem está colocado onde termina a Terra. A mulher, onde começa o Céu. Te amo!

Às minhas filhas Mariana e Juliana, frutos desse encontro de duas almas aquecidas no ideal de melhorar moral e intelectualmente, agradeço todo o esforço e compreensão que conseguem oferecer nessa difícil tarefa de superação dia após dia, que fique registrado em vossas almas a gratidão e orgulho que sinto por conviver ao alcance de vossos afetos.

À minha querida e admirada mãe, pelo seu exemplo de luta, superação e amizade, pela sua persistência em dar o melhor para seus filhos dentro dos limites do trabalho e da honestidade, meu profundo agradecimento.

Ao meu amigo e querido pai (em memória), pelo seu exemplo de sensibilidade ao próximo e senso de humanidade demonstrado durante a vida , meu eterno reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente ao Deus, amoroso e infinito em todos seus atributos, esta oportunidade de crescimento .

À minha irmã Adriana por todo o incentivo profissional, pela torcida e pelo seu profissionalismo.

Agradeço ao meu amigo e orientador Prof Francisco Antônio Helfenstein Fonseca pela amizade, confiança nestes anos, pela orientação nesta tese, pelo incentivo e apoio e pelo ensinamento de que podemos vencer sem derrotar e que devemos colocar na oratória além do conhecimento técnico, a alma e o amor nas palavras e gestos.

A Prof^ª. Maria Cristina de Oliveira Izar pelo apoio, apoio que fez toda diferença no meu aprendizado pela sua dedicação, conhecimento e formação profissional exímia na pesquisa científica, capacidade de trabalho editorial da mais alta qualidade, incentivo e orientação, mas principalmente pelo exemplo.

Ao colega e amigo Carlos Manoel Monteiro pela companhia, apoio e confiança demonstrados durante estes anos, pela sua experiência familiar e senso de humanidade.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Carvalho, por acreditar no meu potencial e servir como incentivo para continuar nesse desafio do conhecimento científico.

A Ana Maria Máximo Cardoso, Darce Costa e Cristina Biava pela dedicação e carinho com os pacientes e pela prontidão em me ajudar sempre.

Às companheiras de pesquisa Andreza Oliveira dos Santos e Tatiana Helfenstein, Simone Fischer e ao colega Waldir Gabriel Miranda Relvas por auxiliar-me e compartilharem do trabalho desde o início.

Aos fraternos colegas do Setor de Lípidos e Hipertensão: Thereza Monteiro, Mônica Rizzo, Altamira, Edson Bibiano, Vânia, Prof. Rui Pova e Dra Thereza Bombig pelo apoio e carinho em todos esses anos.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia da USP: Prof Magnus Gidlund, Andrea Monteiro, Eduardo Ramos, Gabriela Tonini e Silvana Silva que foram de grande ajuda nas dosagens dos anticorpos.

Aos amigos Eneas, Hercules, Faustino, Eryberto, Hilton, Margarete, Arlete, Ondina, Enedina, por todas as risadas, compreensão e colaboração para a realização desta obra.

Aos meus queridos avós (em memória), por todo carinho, atenção e paciência que sempre dedicaram na minha formação moral e espiritual.

Compromisso com a Consciência

- "Prefira afrontar o mundo servindo a sua consciência, a afrontar sua consciência para ser agradável ao mundo "

Humberto de Campos

Quem somos nós

A criatura humana é a sua realidade íntima, autodescobrir-se para identificar as próprias necessidades, eis o grande desafio existencial .

Joanna de Angelis

Esta tese foi realizada com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à
pesquisa do Estado de São Paulo / FAPESP.

Projeto nº 2004/00324-1

SUMÁRIO

Dedicatórias	v
Agradecimentos	vi
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xiv
Lista de abreviaturas e símbolos	xvi
Resumo	xix
Abstract	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Relevância da hipertensão arterial nas doenças cardiovasculares	2
1.2 Efeitos da terapia anti-hipertensiva em parâmetros metabólicos e vasculares	3
1.3 Hipertensão arterial como fenótipo tardio de alterações metabólicas e vasculares	4
1.3.1 Hipertensão arterial e síndrome metabólica	4
1.3.2 Hipertensão como doença inflamatória	6
1.4 Oxidação de lipoproteínas e aterosclerose	7
1.5 Alterações imunológicas na doença hipertensiva	12
2. OBJETIVOS	15
3. MÉTODOS	17
3.1 Casuística	18
3.1.1 Características dos pacientes	18
3.1.2 Desenho do estudo	19

3.1.3	Critérios de exclusão	19
3.2	Método	19
3.2.1	Parâmetros clínicos e eletrocardiográficos	19
3.2.2	Exames laboratoriais	20
3.2.3	Vasodilatação dependente e independente do endotélio	23
3.3	Aspectos Éticos	24
3.4	Análise Estatística	24
4.	RESULTADOS	26
4.1	Características de base da população estudada	27
4.2	Valores obtidos para o perfil lipídico no período basal	28
4.3	Parâmetros bioquímicos não lipídicos basais	28
4.4	Valores basais obtidos para os estudos de vasorreatividade	29
4.5	Valores basais para anticorpos anti LDL oxidada (anti-oxLDL)	30
4.6	Efeitos do tratamento anti-hipertensivo na pressão arterial casual e na MAPA	30
4.7	Parâmetros lipídicos obtidos após tratamento anti-hipertensivo	31
4.8	Parâmetros bioquímicos não lipídicos obtidos ao final do tratamento	32
4.9	Modificações na vasorreatividade de acordo com o tratamento anti-hipertensivo	33
4.10	Efeitos do tratamento anti-hipertensivo nos títulos de anticorpos para LDL oxidada	36
4.11	Correlações com anticorpos anti LDL oxidada	37
4.12	Regressão linear para os anticorpos anti LDL oxidada	38

5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS	50
8. ANEXO	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Dilatação mediada pelo fluxo por tratamento anti-hipertensivo 34**
- Figura 2 – Dilatação vascular independente do endotélio por tratamento anti-hipertensivo 35**
- Figura 3 – Títulos de anticorpos para a LDL oxidada no período basal e após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo 36**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características basais da população estudada por grupos	27
Tabela 2 - Valores obtidos para o perfil lipídico por grupo de tratamento	28
Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos não lipídicos basais por tratamento	29
Tabela 4 - Valores basais obtidos para os estudos de vasorreatividade	29
Tabela 5 - Valores basais de anticorpos da LDL oxidada por grupos de tratamento	30
Tabela 6 - Pressões arteriais casuais e obtidas pela MAPA por grupos, após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo	31
Tabela 7 - Parâmetros bioquímicos obtidos após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo	32
Tabela 8 - Parâmetros bioquímicos não lipídicos após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo	33
Tabela 9 - Correlações com anticorpos anti LDL oxidada no basal	37
Tabela 10 - Correlações com anticorpos anti LDL oxidada após 12	

semanas de tratamento anti-hipertensivo	38
Tabela 11 - Regressão linear para os títulos de anticorpos anti LDL	
oxidada no basal	38
Tabela 12 - Regressão linear para os títulos de anticorpos anti LDL	
oxidada após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlet
Abs	Anticorpos
ACC	Antagonista do canal de cálcio
ANOVA	Análise de variâncias
Anti-LDLox	Anticorpo anti-LDL oxidada
Apo	Apolipoproteína
AVC	Acidente vascular cerebral
CH_2	Grupo metileno
CuSO_4	Sulfato de cobre
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
ED	Endotélio dependente
EDTA	Ácido tetra-acético diamino etileno
EID	Endotélio independente
ERN	Espécies reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies reativas de Oxigênio
FMD	Dilatação mediada pelo fluxo
FR	Fator de risco
GLM-mr	Análise de variâncias com medidas repetidas
GSH	Glutathiona reduzida

H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
HCTZ	Hidroclorotiazina
HDL-c	Lipoproteína colesterol de alta densidade
HOCL	Ácido Hipocloroso
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IECA	Inibidor da enzima conversora da angiotensina
IgGs	Imunoglobulinas
INDA	Indapamida
IQR	Escalas interquartis
IR	Índice de reatividade
KDa	Kilodalton
L•	Radical alquila
LDL-c	Lipoproteína colesterol de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LO•	Radical alcoxila
LOO•	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LOX-1	Receptor endotelial para LDL oxidada
MAPA	Monitorização ambulatorial da pressão arterial
MDA	Malondialdeído

mLDL	Lipoproteína de baixa densidade modificada
MM-LDL-OX	LDL minimamente oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NCEP	<i>National Cholesterol Education Panel</i>
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
OD	Densidade ótica
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão salino fosfato
PCRs	Proteína C reativa de alta sensibilidade
PER	Perindopril
SEM	Erros-padrão das médias
SMet	Síndrome metabólica
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
WHO	<i>World Health Organization</i>

Resumo

Objetivos: Lipoproteínas oxidadas e anticorpos (Abs) anti-LDL oxidada (anti-LDLox) foram detectados no plasma em resposta à elevação da pressão arterial, sugerindo a participação do sistema imune adaptativo. Postulamos que o tratamento da hipertensão possa modificar a resposta imune diminuindo o estímulo oxidativo. Analisamos os títulos de Abs anti-LDLox após adequado controle da hipertensão arterial. **Métodos:** Títulos de Abs anti-LDLox foram examinados em pacientes com hipertensão arterial no estágio 1 (n=94), sem manifestação clínica prévia de aterosclerose ou fatores de risco clássicos para a doença coronariana e isentos de medicações anti-hipertensivas. Pacientes foram distribuídos aleatoriamente para terapia com perindopril, hidroclorotiazida ou indapamida por 12 semanas, com adição de perindopril, se necessário para adequado controle pressórico. Títulos de Abs anti-LDLox foram mensurados por ELISA. **Resultados:** O tratamento anti-hipertensivo reduziu as pressões arteriais casuais e as obtidas pela MAPA ($p < 0,0005$), diminuiu os níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($p < 0,05$) e aumentou os títulos dos Ab anti-LDLox ($p < 0,005$) e a dilatação mediada pelo fluxo ($p < 0,0005$), independentemente do tratamento instituído. **Conclusões:** Aumento nos títulos de Abs anti-LDLox após terapia anti-hipertensiva ao lado de melhor função endotelial e diminuição do estresse oxidativo sugerem que a despeito de maior estímulo oxidativo estar presente na hipertensão, os Abs anti-LDLox podem ser potenciais biomarcadores protetores para monitorizar o tratamento da hipertensão.

Palavras-chaves: Hipertensão; LDL; Oxidação; Anticorpos; Endotélio; Tratamento.

Abstract

Objectives: Oxidized lipoproteins and autoantibodies anti-oxidized LDL (anti-oxLDL) have been detected in human plasma in response to blood pressure elevation. Thus, treatment of hypertension, by decreasing the stimuli for oxidation, may have an effect on the immune response. We aimed to assess early changes on anti-LDLox Abs after blood pressure control. **Methods:** Titers of human anti-oxLDL Abs were measured in subjects with recently diagnosed hypertension on stage 1 (n=94), in primary prevention of coronary disease, with no other risk factors, and naïve of anti-hypertensive medication at entry. Subjects were randomly assigned to receive perindopril, hydrochlorothiazide or indapamide during 12 weeks, with addition of perindopril if necessary to achieve blood pressure control. Abs anti-oxLDL were measured by ELISA. **Results:** Twelve-week anti-hypertensive treatment reduced both office-based and ambulatory blood pressure monitoring measurements ($p<0.0005$), decreased plasma TBARS ($p<0.05$), increased titers of anti-oxLDL Abs ($p<0.005$), and improved endothelial dependent vasodilation ($p<0.0005$), independently of treatment assignment. **Conclusions:** Increase in titers of Abs anti-oxLDL with improvement in endothelial function and reduction in oxidative stress suggests that albeit hypertension increases the oxidation stimuli, Abs anti-oxLDL may be protective and potential markers in the follow-up of hypertension treatment.

Key words: Hypertension; LDL; Oxidation; Antibodies; Endothelium; Treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Relevância da hipertensão arterial nas doenças cardiovasculares

A elevação da pressão arterial (PA) é um fator de risco independente para doença cardiovascular⁰¹ e determina custos médicos e sócio-econômicos elevados, decorrentes principalmente de suas complicações, tais como: doença cérebro-vascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades.

Estima-se que exista cerca de um bilhão de indivíduos hipertensos no mundo, sendo a hipertensão arterial responsável por aproximadamente 7,1 milhões de óbitos por ano⁰².

Dados do Ministério da Saúde e da Secretaria Municipal de Saúde da cidade de São Paulo confirmam a freqüência e a gravidade dessas doenças no nosso meio. Na cidade de São Paulo ocorreram no ano 2000, mais de 28% de todas as mortes decorreram de causas cardiovasculares⁰³. As doenças do aparelho circulatório constituíram aproximadamente 32% das causas de morte no Brasil, superando neoplasias, infecções e mortes violentas. A principal causa de morte em todas as regiões do Brasil foi o acidente vascular cerebral (AVC), para ambos os sexos⁰⁴.

Para se ter uma idéia da grandeza desses números, no mesmo período, a síndrome de imunodeficiência adquirida, as neoplasias, os acidentes automobilísticos e os homicídios, juntos, foram responsáveis por aproximadamente 18% das mortes. Nos EUA, 40,6% das mortes ocorreram por doença cardiovascular, sendo 12 milhões os óbitos por doença coronariana⁰⁵.

Dados globais da Organização Mundial de Saúde⁰⁶ evidenciam que a doença

cerebrovascular, cujo fator de risco principal é a hipertensão, teve redução anual das taxas ajustadas por idade de 1,5% para homens e 1,6% para mulheres. O conjunto das doenças do coração, hipertensão, doença coronária e insuficiência cardíaca também tiveram taxas anuais decrescentes de 1,2% para homens e 1,3% para mulheres. No entanto, apesar do declínio, a mortalidade no Brasil ainda é elevada em comparação a outros países, tanto para doença cerebrovascular como para doenças do coração⁰⁷.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é responsável por 25% das mortes por doença coronariana⁰⁸. A mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da PA, a partir de 115/75 mm Hg⁰⁹. Mais expressiva ainda é sua relação com a mortalidade pelo acidente vascular cerebral, que constitui a terceira causa de morte em todo o mundo^{10,11} e a primeira em nosso país¹². Entretanto, o principal substrato fisiopatológico associado com a HAS é a aterosclerose, a maior causa de doença cardiovascular (DCV), presente não apenas nas artérias que irrigam o tecido cerebral, mas em todo o sistema vascular, em particular o coronariano¹⁰.

1.2. Efeitos da terapia anti-hipertensiva em parâmetros metabólicos e vasculares

O tratamento farmacológico da HAS reduz drasticamente o risco de AVC, entretanto atenua de forma menos significativa a doença coronariana, especialmente quando foram estudados os efeitos de diuréticos e betabloqueadores.

Por outro lado, outras classes de agentes anti-hipertensivos parecem capazes de modificar a aterosclerose experimental, influenciando a deposição lipídica, função endotelial e atividade inflamatória¹³⁻¹⁵. Diferenças entre os diuréticos hidroclorotiazida, indapamida e espironolactona foram relatadas em relação à função endotelial e à peroxidação lipídica^{16,17}. Alguns grandes estudos em humanos, com poder para avaliação de desfechos clínicos, mostraram importante atenuação da doença coronariana e cerebrovascular¹⁸⁻²¹.

Como o enchimento coronariano ocorre predominantemente durante a diástole, seria desejável que os agentes anti-hipertensivos possuíssem efeitos pleiotrópicos vasculares ao lado da redução pressórica de forma a uma simultânea atuação sobre mecanismos da aterosclerose disparados pela HAS com possíveis benefícios na história natural da doença arterial coronariana (DAC).

1.3. Hipertensão arterial como fenótipo tardio de alterações metabólicas e vasculares

1.3.1 Hipertensão arterial e síndrome metabólica

A HAS é um dos constituintes da síndrome metabólica (SMet)²², uma condição geralmente associada com resistência à insulina e obesidade, além de dislipidemia, e que apresenta notória importância entre os temas atuais de prevenção da DAC.

Neste aspecto, os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) e os bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II parecem reduzir o aparecimento de novos casos de diabetes e propiciar maior proteção aos órgãos-

alvo, em particular rins e coração do que outros agentes anti-hipertensivos^{18,21}.

Por outro lado, diuréticos estão associados com maior incidência de diabetes e particularmente quando associados aos betabloqueadores podem promover alterações desfavoráveis no perfil lipídico^{23,24}, especialmente para níveis mais baixos do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e mais elevados de triglicérides. Além disso, modificações nos canais de potássio por déficit deste íon e de magnésio, pelo tratamento com diuréticos, além de maior ativação do sistema renina angiotensina aldosterona poderiam limitar os benefícios de proteção vascular associados ao uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA)^{25,26}.

Em suporte a este aspecto, metanálise examinando os efeitos de doses altas de diuréticos no tratamento da hipertensão arterial não conseguiu demonstrar redução na mortalidade por DAC, apenas benefício no AVC¹³, e mais recentemente no estudo ACCOMPLISH²⁷, foi descrito que com similares reduções pressóricas, a associação do benazepril (IECA) com anlodipino (ACC) foi mais efetiva na redução de desfechos cardiovasculares do que o uso do benazepril associado à hidroclorotiazida.

Na IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Tratamento da Aterosclerose²⁸, foram reconhecidos como critérios agravantes do risco coronariano, a síndrome metabólica (SMet), história familiar de DAC prematura, hipertrofia miocárdica, insuficiência renal, níveis altos de proteína C reativa, micro e macroalbuminúria, além de aterosclerose subclínica, devido a maior risco na mortalidade coronariana, cardiovascular ou mesmo de mortalidade em geral, quando comparados aos não portadores da síndrome²⁹, para estratificação do risco cardiovascular.

Existem vários critérios para definir SMet, entre eles o da *International Diabetes Federation* (IDF, 2005)³⁰, o qual inclui valores mais rigorosos para a circunferência abdominal e níveis glicêmicos, além de utilizar uma classificação da circunferência abdominal baseada nas características étnicas das populações descritas. Nesta definição, valores de corte mais rigorosos foram assumidos na tentativa de identificar precocemente indivíduos com maior propensão a distúrbios metabólicos e ao diabetes *mellitus* tipo 2.

De forma interessante, alguns agentes anti-hipertensivos, como os bloqueadores do sistema renina angiotensina propiciam melhora da função endotelial³¹, diminuição da resistência à insulina³², maior preservação funcional de células beta-pancreáticas³³, redução da atividade inflamatória e do risco trombótico³⁴, sendo a escolha destes agentes anti-hipertensivos em pacientes com SMet aparentemente vantajosa nesta situação.

1.3.2 Hipertensão como doença inflamatória

A hipertensão arterial incide principalmente em indivíduos de meia idade ou mais idosos, geralmente em associação a presença de marcadores inflamatórios^{35,36}. De fato, utilizando dados de base populacional nos EUA, o estudo *National Health and Nutritional Examination Survey* (NHANES) III³⁵, identificou níveis progressivamente aumentados da prevalência de aumento de proteína C reativa de alta sensibilidade (PCRas) maiores do que 3 mg/L para cada aumento de pressão sistólica, desde o estágio pré-hipertensivo. Mais recentemente, estudo envolvendo grande população de idosos não hipertensos na condição basal, mostrou que em apenas dois anos de seguimento médio, a

incidência de hipertensão arterial foi aproximadamente 50% maior para cada 1 mg/L de aumento nos níveis basais de PCRas³⁶. Outros marcadores inflamatórios incluem níveis de várias citocinas, sendo a redução de adiponectina, outra condição associada com o subsequente desenvolvimento de hipertensão arterial. Paralelamente a estes aspectos bioquímicos, uma mudança do fenótipo da célula endotelial também ocorre em associação com a idade e a progressiva elevação da PA. Neste sentido, um fenótipo mais inflamatório, com aumento de expressão de proteínas relacionadas à ativação do fator nuclear *kappa* beta (NF- κ B), entre as quais várias moléculas de adesão vascular relacionadas ao desenvolvimento da aterosclerose pode ser relevante para desfechos cardiovasculares³⁷.

1.4 Oxidação de lipoproteínas e aterosclerose

A aterosclerose é uma doença da parede arterial que está associada com a diminuição progressiva da função das células endoteliais³⁸, acúmulo de lípidos em macrófagos e ativação de células do sistema imune³⁹. A primeira manifestação da doença aterosclerótica pode incluir, em um número cada vez maior de indivíduos, a morte súbita, o infarto do miocárdio, a doença cérebro vascular, complicações da doença aneurismática da aorta ou mesmo insuficiência vascular periférica⁴⁰. Essas manifestações tendem a acometer o homem em etapa produtiva da vida, determinando forte impacto para a sociedade e para sua família.

Está atualmente bem estabelecido que níveis plasmáticos elevados de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) constituem fator de risco crucial para o desenvolvimento da aterosclerose. Essa lipoproteína é a principal transportadora de colesterol sérico (70% está ligado a esta lipoproteína). A

lipoproteína tem papel importante na oferta de colesterol para tecidos extra-hepáticos, por meio da ligação ao receptor (LDL) na membrana plasmática⁴¹.

As modificações na LDL vêm sendo estudadas por diferentes métodos. Diversas afecções, como infecções, inflamações e doenças auto-imunes são associadas com a modificação das LDL. Essas modificações incluem metilação, acetilação, glicação e oxidação^{38,39}. A oxidação é um dos processos de modificação mais estudados e pode ser induzida *in vitro* por metais de transição como o cobre e o ferro⁴².

A hipótese de que a oxidação torna a partícula de LDL mais aterogênica, foi originalmente proposta por dois grupos vindos de direções completamente diferentes. Um grupo em Cleveland observou que a LDL em cultura de células podia causar lesão celular e mostrou que a lesão dependia da modificação oxidativa sobre a LDL⁴³. Outro grupo da Universidade da Califórnia observou que as LDL nativas não induziam a formação de células espumosas, demonstrando em culturas de células que era possível modificar a LDL na camada média da parede vascular para a forma reconhecida pelos receptores de varredura dos macrófagos e mostrou que este foi o resultado da modificação oxidativa⁴⁴.

A modificação oxidativa da LDL *in vivo* parece ocorrer em dois estágios. O primeiro, antes que os monócitos sejam ativados, resulta na oxidação dos lípidos da LDL, com pequena alteração na apolipoproteína B (apo B), constituindo a LDL minimamente oxidada ou MMLDLox. O segundo começa quando os monócitos são ativados e convertidos em macrófagos. Nesse estágio, os lípidos da LDL são adicionalmente oxidados, assim como a fração protéica (apo B). Essas LDL altamente oxidadas (LDLox) deixam de ser reconhecidas pelos

receptores clássicos de LDL, porém são reconhecidas pelos receptores de LDL acetilados (removedores) e/ou receptores da LDL oxidada, que não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol⁴⁵.

Recentes estudos têm dado importância ao delineamento do mecanismo pelo qual a LDL nativa pode ser convertida à forma reconhecida pela família de fatores de crescimento e receptores de varredura (*scavengers*), relacionados à formação de células espumosas⁴⁶.

A oxidação nos lipídeos presentes na LDL gera uma grande quantidade de subprodutos como aldeídos que são capazes de reagir com resíduos de lisina presentes na apo B, modificando a partícula e contribuindo para a formação da LDL aterogênica.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são os principais mediadores da modificação oxidativa da partícula³⁹. A modificação oxidativa da LDL induz o aparecimento de epítomos imunogênicos na molécula de LDL e a presença de anticorpos contra a LDL oxidada tem sido encontrada no soro humano⁴⁷.

As ERO incluem radicais livres e outras que, embora não possuam elétrons livres, são muito reativas devido à sua instabilidade. Por esta razão, esse termo tem sido mais utilizado.

Radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou íon que possui um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência. Esses elétrons desemparelhados ou livres têm uma instabilidade química muito grande, e sendo assim, mesmo com uma meia vida de frações de segundos, são altamente reativos e capazes de reagir com qualquer composto que esteja

próximo, a fim de retirar desse composto, seja uma molécula, célula, ou tecido, o elétron necessário para sua estabilização, produzindo reações em cadeia de dano celular⁴⁸. Esta definição engloba o átomo de hidrogênio (que possui um elétron desemparelhado), a maioria dos íons de metais de transição e o oxigênio molecular.

Os radicais livres de oxigênio são formados em ambientes de re-oxigenação vindos da cadeia respiratória mitocondrial. As células também produzem radicais livres de oxigênio por outras fontes: enzimas oxidantes (aldeído oxidase, flavina desidrogenase, ciclooxigenase, NADPH oxidase e sistema citocromo P450 oxidase); auto-oxidação de pequenas moléculas (catecolaminas, flavinas e hidroquinonas); e sistema de carregadores de elétrons microsossomais e das membranas nucleares, entre outras⁴⁹.

Os radicais livres incluem todos os radicais do oxigênio. Há também as ERN que incluem o peroxinitrito (ONOO^-), o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e o radical dióxido de nitrogênio ($\cdot\text{NO}_2$). Embora não sejam radicais livres, o ânion peroxinitrito (ONOO^-), o ácido hipocloroso (HOCl), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$) e o ozônio (O_3), podem induzir reações radicalares no organismo, sendo por isso também consideradas como espécies reativas⁵⁰.

Para se protegerem contra oxidações os organismos dispõem de mecanismos químicos e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, selênio, ácido ascórbico (vitamina C) e glutatona reduzida (GSH) diminuem a ação tóxica das EROs produzidas nos compartimentos intra- e

extracelulares. No segundo caso, quando são expostos às ERO os organismos sintetizam proteínas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase para decomponem respectivamente o ânion O^{2-} , H_2O_2 e lipoperóxidos⁵⁰. Apesar de essas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por ERO, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente. Quando isso acontece, ocorre estresse oxidativo⁴². As ERO produzidas por estas células quando ativadas por microrganismos patogênicos atuam como bactericidas sendo, portanto, um importante meio de proteção orgânica contra o desenvolvimento de infecções oportunistas. Portanto, a manutenção das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas em equilíbrio dinâmico com a formação de ERO no organismo é fundamental para a sua sobrevivência.

Um dos alvos susceptíveis de oxidação por ERO são os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares. Uma característica da peroxidação lipídica é a ocorrência de reações em cadeia as quais, se não terminadas, ocorrem continuamente, destroem fases lipídicas, alterando especialmente as membranas e modificam partículas de lipoproteínas. Além das modificações, os produtos de quebra da peroxidação lipídica são considerados tóxicos as células e podem alterar proteínas, criando regiões de epítomos, que desencadeiam respostas imunológicas⁴³.

Íons de metais de transição, como ferro e cobre, podem participar do processo catalisando a formação de radicais lipídicos alcoxila, peroxila e hidroxila a partir dos hidroperóxidos.

1.5 Alterações imunológicas na doença hipertensiva

Em uma época de avanço tecnológico exuberante e que se estuda o desenvolvimento de vacina para aterosclerose e hipertensão arterial⁵¹, a ativação imune parece parte integrante da fisiopatologia da hipertensão arterial e suas comorbidades.

Vários estudos evidenciam a participação de mecanismos imunológicos na modulação da patogênese da aterosclerose e hipertensão arterial⁵². Durante o processo aterosclerótico, diferentes antígenos, dentre eles LDLox e seus produtos de degradação, desencadeiam uma resposta inflamatória que resulta na ativação de diversos genes em células endoteliais, células musculares lisas, monócitos/macrófagos, células B e T. Estes eventos podem induzir o aumento ou diminuição de moléculas de adesão e secreção de citocinas, da expressão de receptores, na diferenciação celular entre outras propriedades consideradas alvos em potencial para o tratamento e prevenção da aterosclerose.

Os lípidos modificados na superfície da LDL são biologicamente ativos e reconhecidos por vários receptores do sistema imune inato. A LDLox é também capaz de ativar o sistema imune adaptativo. A modificação oxidativa da LDL induz ao aparecimento de epítomos imunogênicos e anticorpos contra LDLox (anti LDLox)³⁹.

Linfócitos T CD4+, também já foram encontrados em placas ateroscleróticas. Há evidências que estas células estão envolvidas na secreção de citocinas antiinflamatórias/antiaterogênicas como IL-13 e IL10, funcionando assim na supressão das células endoteliais e macrófagos⁴⁴.

Linfócitos B em lesões ateroscleróticas são raros, porém tem-se demonstrado que essas células apresentam uma participação importante nos mecanismos envolvidos em proteção contra o desenvolvimento da aterosclerose. Os seus subprodutos, os anticorpos, são facilmente encontrados em lesões, onde predominam as imunoglobulinas (IgGs) ⁴⁵.

Anticorpos contra LDLox estão presentes na circulação e seus níveis têm sido correlacionados positivamente com a doença cardiovascular e suas complicações ⁴⁶.

A resposta imune humoral contra LDLox tem sido alvo de estudos que tentam correlacionar modificações oxidativas e seus produtos gerados, com o desenvolvimento de placas ateroscleróticas. Existe, porém, uma grande dificuldade neste tipo de estudo devido à variedade de componentes que podem ser gerados e encontrados (polipeptídeos, peptídeos, lipídeos e formas mistas) durante o processo de oxidação da partícula de LDL e conseqüentemente na variedade de anticorpos potencialmente gerados contra esses produtos.

Estudos clínicos e experimentais ⁵²⁻⁵⁶ mostraram que auto-anticorpos contra LDLox estão relacionados com a modulação do processo aterosclerótico.

Tendo em vista evidências recentes, tem-se especulado sobre a existência de diferentes “famílias” de auto-anticorpos contra LDLox, os “pró-aterogênicos” e os “anti-aterogênicos”⁴⁴. Neste cenário, não apenas haveria diferenças nas implicações dos títulos de diferentes auto-anticorpos com a aterosclerose ou suas complicações, bem como são poucos os estudos evolutivos de títulos de auto-anticorpos para melhor caracterização de uma situação de maior risco cardiovascular, como a doença hipertensiva não tratada e o alcance de

metas adequadas de PA com terapia farmacológica ou mudanças no estilo de vida.

Avanços em biologia vascular mostraram que a inflamação desempenha um papel crucial no desenvolvimento da doença cardiovascular. Estudos avaliando a PCRas mostraram que esse biomarcador inflamatório prediz o risco de desfechos cardiovasculares, de maneira aditiva a fatores de risco tradicionais, adicionando informação prognóstica à estratificação de risco e predizendo o risco cardiovascular de longo prazo em indivíduos mesmo sem evidência de doença cardiovascular⁵⁷. Níveis elevados de PCRas e de LDLox também podem indicar situação de maior risco para aterosclerose avançada ou vulnerável a desfechos⁵⁸.

Dessa forma, cenários clínicos em que haja dano oxidativo, como na presença de fatores de risco, em pacientes com alto risco de eventos cardiovasculares, ou aqueles na vigência de uma síndrome coronariana aguda, o papel da LDL oxidada e da resposta imune inata, com a produção de anticorpos anti-LDL oxidada pode ter influência nas respostas da parede arterial e conseqüentemente na aterogênese e suas complicações.

Neste sentido, uma melhor compreensão da hipertensão arterial, o mais comum fator de risco associado à doença cardiovascular, como doença imune-inflamatória é essencial para um mais adequado controle desta condição.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Examinar os efeitos da terapia anti-hipertensiva nas modificações bioquímicas, imunológicas e de vasorreatividade fluxo-mediada em indivíduos portadores de hipertensão arterial sem outros fatores de risco cardiovascular clássicos, como diabetes *mellitus*, dislipidemia ou tabagismo.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar alterações no perfil lipídico, glucometabólico, peroxidação lipídica e vasoreatividade dependente e independente do endotélio decorrentes do tratamento anti-hipertensivo por 12 semanas.

Comparar as modificações obtidas nos parâmetros mencionados pela terapia baseada em três diferentes estratégias iniciais, perindopril, hidroclorotiazida ou indapamida por seis semanas, quando necessário acrescida de 4 mg de perindopril para mais adequado controle pressórico nas seis semanas seguintes.

Examinar o comportamento dos títulos de auto-anticorpos (Abs) anti-LDLOxidada, na condição basal e ao final do tratamento anti-hipertensivo e correlacioná-los com marcadores do risco cardiovascular.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1 Características dos pacientes

Foram incluídos no estudo indivíduos, de meia idade, de ambos os gêneros, com hipertensão arterial no estágio 1⁵, em prevenção primária da doença coronária, sem outros fatores de risco clássicos para a doença coronariana e sem uso de terapia antihipertensiva. O cálculo da amostra foi estimado a partir dos objetivos principais do estudo, buscando-se um poder de 80% e risco alfa de 5%, com base em prévios estudos, envolvendo função endotelial, modificações lipídicas, glucometabólicas e na resposta imune. Assim, foi prevista a necessidade de inclusão de 90 pacientes ao estudo de acordo com seu delineamento que incluía três braços terapêuticos de 30 pacientes.

Hipertensão arterial foi definida com base na média de três medidas da pressão arterial ≥ 140 mm Hg para sistólica(PAS) e/ou ≥ 90 mm Hg da diastólica (PAD) com o paciente sentado obtido após um período de cinco minutos e repetido em intervalos de 5 minutos. Todas as medidas foram realizadas no mesmo membro, após a escolha com base na medida de ambos os braços (elegendo-se o braço de maior medida da pressão arterial). A hipertensão do jaleco branco foi afastada com a utilização da monitorização arterial da pressão arterial (MAPA) por 24 h que mostrou pelo menos uma medida (média da PA sistólica ou diastólica de 24 h) acima da variação normal⁵⁹.

3.1.2 Desenho do Estudo

Estudo prospectivo em hipertensos, isentos de terapia anti-hipertensiva no momento de inclusão que foram aleatoriamente alocados para terapia anti-hipertensiva inicial, de maneira duplo-cega para perindopril (grupo IECA, 4mg/d), hidroclorotiazida (grupo HCTZ, 25 mg/dia) ou indapamida (grupo INDA, 1,5 mg/d), durante seis semanas. A esta terapia, foi acrescentado de forma aberta, perindopril 4 mg por mais seis semanas, para os pacientes que não haviam atingido adequado controle pressórico (PA casual < 140/90 mm Hg). As drogas foram codificadas e encapsuladas antes da randomização e somente o farmacêutico sabia do código do tratamento.

3.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com outros fatores de risco clássicos, como hipercolesterolemia, diabetes ou tabagismo. Além disso, terapia de reposição hormonal, co-morbidades como insuficiência renal ou hepática, doença inflamatória ou infecciosa ativas, também constituíram critérios para exclusão dos pacientes.

3.2 Método

3.2.1 Parâmetros clínicos e eletrocardiográficos

Dados demográficos, antropométricos e parâmetros do exame físico foram coletados no início e no fim do estudo. Eletrocardiograma de doze derivações foi executado na entrada. Uma visita intermediária em seis semanas foi realizada para avaliar o controle de pressão do sangue e para adicionar o perindopril (4mg) aos pacientes que não estavam nas metas pressóricas. As medidas da MAPA de 24 hrs (Spacelabs 90207, Seattle, WA, EUA) foram gravadas no início e após 12 semanas.

3.2.2 Exames laboratoriais

Amostras sanguíneas foram coletadas após 12-14 h de jejum para todos os pacientes no início e após 12 semanas de tratamento.

Colesterol total, lípides e apolipoproteínas

O colesterol sérico total, HDL-c e triglicerídeos foram determinados enzimaticamente (Ópera Bayer, Alemanha) sendo o LDL-c estimado pela equação de Friedewald⁶⁰ quando triglicerídeos < 400 mg/dL.

Os níveis de glicemia foram avaliados pelo método enzimático e a hemoglobina glicada (HbA1c) foi medida por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Concentrações do apolipoproteínas (Apo) A1 e B100 foram determinadas por nefelometria (Array 360 Beckmann, Alemanha). Os eletrólitos (sódio, potássio e cálcio ionizado) e creatinina foram medidos automaticamente

(Ópera Bayer, Alemanha).

Marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo

Proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCRas) foi medida por nefelometria (R100 analisador, Behringer, Alemanha), e estimativa da peroxidação do plasma foram avaliados pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), predominantemente o malondialdeído (MDA)⁶¹.

Análise de autoanticorpos da LDL oxidada (LDLox)

Preparação da LDL e da LDL-ox

Foi colhido o sangue de um único voluntário saudável, normolipidêmico, em jejum de 12 horas, e obtido o plasma com ácido tetra-acético diamino etileno (EDTA) após centrifugação (1.000 x 10 g, 4°C, por 15 minutos). Benzamidina (2 mmol/l), gentamicina (0,5%), cloramfenicol (0,25%), fenil-metil-sulfonilfluorida (0,5 mmol/l) e aprotinina (0,1 U/ml) foram adicionados ao plasma. A fração LDL (1.006 < d < 1.063 g/ml) foi isolada por ultracentrifugação seqüencial (100.000 x g, 4°C), usando um rotor 50Ti (L-8 ultracentrifuge, Beckman, Palo Alto, CA, EUA), e dializado depois disso (4°C) em tampão PBS (*phosphate-buffered saline*; pH 7,4), contendo EDTA (0,01%). A preparação de LDL foi esterilizada por filtração por meio de um filtro de 0,22 milímetros (Milipore, Alemanha).

Para obter a LDLox, a LDL obtida no processo anterior foi dializada durante a noite em tampão PBS livre de EDTA, seguida pela incubação com

CuSO₄ (2,5 mol/l por mg de proteína de LDL; 18 h; 37°C). O processo da oxidação foi parado pela adição de 1 mmol/L de EDTA.⁶² Este procedimento foi padronizado no laboratório do prof. Magnus Gidlund e resulta em uma LDL completamente oxidada, como definido por uma fase do platô no ensaio dos TBARS e por aumento das cargas negativas da partícula.⁶³

Determinação dos anticorpos anti-LDL oxidada

Para determinar os anticorpos anti-LDL oxidada pelo CuSO₄, nós usamos nossa próprio ensaio, previamente descrito no mesmo laboratório.⁶²⁻⁶⁷

Placas de ELISA contendo noventa e seis poços foram tratadas com a LDLox obtida previamente (7,5 µg/ml; 50 µl por poço), suspensas em tampão carbonato/bicarbonato (0,1 mol/l; pH 9,4, durante 18 horas) e deixadas para sensibilização (4°C; durante a noite). Após lavagem com PBS, as placas foram bloqueadas com gelatina (3%) em temperatura ambiente por 24 h. As amostras de soro dos pacientes (50 µl) foram diluídas (1:400) antes que fossem adicionadas aos poços. Após incubação (2 h), as placas foram lavadas com o PBS contendo Tween (0,05%) e a solução do anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase *horseradish* (1:1.000 diluído em PBS; Kirkegaard & Perry Laboratórios, Gaithersburg, MD, EUA) foi adicionada. Após lavagem, 3,3",5,5" - tetrametilbenzidina (6,5% em DMSO; Sigma, EUA), e H₂O₂ (Sigma, EUA) diluídas em tampão citrato/ fosfato (0,1 mol/l; 250 µl; pH 5,5) foram adicionados (temperatura ambiente) como substrato da enzima. A reação foi parada pela adição de H₂SO₄ (2 mol/l) e os títulos de anticorpos anti-LDL oxidada medidos em termos da densidade ótica (OD; λ = 450 nanômetro).

Como pode ocorrer alguma imprecisão na quantificação dos Abs anti-LDLox pelo método de ELISA, IgG (10 mg/ml; IgG humana purificada, Pierce Protein Research Products, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) e um branco (PBS) foram usados como controles para compensar a variação intra-placa. A imprecisão Inter-placa no método ELISA foi minimizada processando-se todas as amostras no mesmo período de tempo, ao fim do protocolo clínico. Para minimizar o número de resultados falso-positivos devido a reação cruzada com epitopos livres de antígeno, os títulos de anticorpos para cada amostra foram expressos por um índice de reatividade (IR), calculado como $IR = (OD_{amostra} - OD_{branco}) / (OD_{IgG} - OD_{branco da IgG})$ onde IgG foi usado como um controle. As amostras correram em triplicatas e um valor médio foi calculado. A variação dentro das triplicatas não excedeu 5% da média.

3.2.3 Vasodilatação dependente e independente do endotélio

Os testes de vasorreatividade foram executados por ultra-sonografista experiente e de acordo com as recomendações para a avaliação ultra-sonográfica da dilatação mediada pelo fluxo (FMD) endotélio dependente (ED) da artéria braquial.⁶⁸ O estudo da função endotelial foi executado pela manhã após o período de jejum noturno. Um aparelho de ultra-sonografia (Sonos 5500, Hewlett- Packard- Phillips, EUA), equipado com o *software* vascular para imagem bidimensional (2D), com as modalidades do ultra-som Doppler espectral e colorido, com monitor interno do eletrocardiograma (ECG), e transdutor linear (com uma escala de frequência de 7.5 a 12.0 MHz), foram usados. Aquisição da imagem, FMD -ED, e

dilatação endotélio-independente (EID) com dinitrato de isosorbida (5 mg; sublingual) foram avaliados. Após um período de descanso (15 minutos), a artéria braquial foi visualizada na fossa antecubital direita e o diâmetro da artéria na condição basal foi medido uma vez a partir de imagem ótima da artéria. A hiperemia reativa foi induzida inflando-se o *cuff* de esfigmomanômetro até 200 mm Hg (ou pelo menos a 50 mm Hg acima da pressão arterial sistólica (PAS) no antebraço distal (5 min), sendo então desinsuflado o *cuff*. As imagens no final da diástole foram obtidas na fase do início do complexo de QRS no traçado de ECG. Estas imagens foram adquiridas na condição basal e 1 min após a desinsuflação do *cuff*. Para EID uma outra imagem foi adquirida no basal e, após 3-4 minutos da administração do nitrato nova imagem foi obtida, sendo as variações percentuais no diâmetro da artéria em relação ao valor de base calculadas para determinação da FMD ou EID. Os valores de variabilidade intra e inter-sonografista foram 1 e 2%, respectivamente.

3.3 Aspectos Éticos

Este projeto foi conduzido na Universidade Federal do São Paulo, após aprovação pelo Comitê de Ética Local e obtenção por escrito do consentimento informado dos pacientes, conforme determina a resolução número 0722 aprovado em 19 de março de 1993, do Conselho Nacional de Saúde.

3.4 Análises estatísticas

Todas as análises foram executadas usando-se o programa estatístico SPSS (17.0) para Windows. Os dados numéricos foram apresentados como valores medianos e interquartis (IQR), ou como médias e erros-padrão das médias (SEM). Variáveis categóricas foram expressas como número de indivíduos e valores percentuais. As variáveis com distribuição não Gaussiana foram logaritmizadas para comparações. A análise de variâncias (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, se necessário, foi usada para amostras independentes e dados numéricos, e o quiquadrado de Pearson usado para variáveis categóricas. Modelo linear geral (GLM) com medidas repetidas foi usado para comparar os efeitos dos tratamentos dentro e entre dos grupos. Testes t de student pareado⁶⁹ ou de Mann-Whitney⁷⁰ foram utilizados para variáveis contínuas na condição basal e ao final do estudo na análise agrupada do efeito do tratamento, respectivamente para variáveis com ou sem distribuição normal. Os coeficientes de correlação com os anticorpos anti-LDLox foram testados usando-se o teste de correlação linear de Pearson. Regressão linear múltipla⁷¹ foi utilizada, considerando os anticorpos anti-LDLox como variável dependente e as variáveis com associação univariada, como variáveis independentes antes e após o tratamento. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características basais da população estudada

A Tabela 1 mostra que os grupos inicialmente alocados para o tratamento com perindopril (PER), hidroclorotiazida (HCTZ) e indapamida (INDA) foram semelhantes em relação à idade, sexo, peso, índice de massa corpórea, frequência cardíaca e pressão arterial sistólica e diastólica. Da mesma forma os valores obtidos para a média de pressão arterial sistólica e diastólica nas 24 horas de monitorização ambulatorial (MAPA) não diferiram entre os grupos.

Tabela 1. Características basais da população estudada por grupos

Parâmetro	PER N=29	HCTZ N=33	INDA N=32	P
Idade*, anos	57 (49-63)	56 (48-64)	59 (50-67)	0,37
Homens, n (%)	15 (51,7)	17 (51,5)	15 (46,9)	0,91
Peso*, kg	76 (60-87)	72 (63-81)	72 (61-83)	0,75
IMC*, kg/m ²	27 (25-32)	27 (26-32)	28 (24-32)	0,84
CA*, cm	95 (87-107)	94 (85-101)	96 (88-106)	0,67
FC*, bpm	80 (72-87)	78 (68-81)	78 (74-86)	0,49
PAS*, mm Hg	150 (143-164)	150 (140-160)	154 (142-160)	0,91
PAD*, mm Hg	90 (90-99)	90 (89-93)	91 (89-99)	0,87
PAS*, média 24h	127 (118-142)	131 (124-143)	131 (119-143)	0,49
PAD*, média 24h	82 (77-90)	83 (75-90)	79 (70-86)	0,16

*valores expressos por mediana e interquartis; IMC = índice de massa corpórea; CA = circunferência abdominal; FC = frequência cardíaca; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; PAS e PAD média de 24 h obtida pela monitorização ambulatorial de pressão arterial (MAPA).

4.2. Valores obtidos para o perfil lipídico no período basal

Os pacientes foram comparáveis em relação aos valores de LDL-c, HDL-c, triglicérides, apolipoproteína B e apolipoproteína A1. Apenas o colesterol total diferiu entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores obtidos para o perfil lipídico por grupo de tratamento

Parâmetro	PER N=29	HCTZ N=33	INDA N=32	P
Colesterol total*	205 (185-228)	198 (169-209)	185 (161-210)	0,04
LDL-C	127 (111-149)	110 (84-137)	115 (93-135)	0,06
HDL-C	47 (41-57)	44 (38-59)	47 (39-60)	0,72
Triglicérides	110 (85-189)	121 (76-189)	108 (93-137)	0,11
Apo B	101 (89-123)	93 (77-111)	89 (69-117)	0,26
Apo A1	128 (110-146)	127 (113-143)	121 (104-146)	0,44

Valores expressos por medianas e interquartis em mg/dL; apo = apolipoproteína; valores de triglicérides foram log transformados. *grupo INDA < grupo PER (ANOVA, teste de Tukey para comparações múltiplas).

4.3. Parâmetros bioquímicos não lipídicos basais

Com relação às demais variáveis bioquímicas, os grupos também foram semelhantes para os valores basais de glicose, hemoglobina glicada, creatinina, cálcio ionizado, potássio, sódio, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína C reativa de alta sensibilidade (PCRas) (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos não lipídicos basais por tratamento

Parâmetro	PER N=29	HCTZ N=33	INDA N=32	P
Sódio, mEq/L	140 (138-142)	142 (141-143)	141 (139-143)	0,14
Potássio, mEq/L	4,2 (3,9-4,5)	4,1 (3,7-4,4)	4,0 (3,8-4,3)	0,28
Creatinina, mg/dL	1,0 (0,8-1,1)	0,9 (0,9-1,1)	0,9 (1,0-1,2)	0,67
Ca ⁺⁺ , mmol/L	1,2 (1,1-1,2)	1,1 (1,1-1,2)	1,2 (1,1-1,2)	0,89
Glicose, mg/dL	93 (81-104)	87 (84-97)	87 (76-95)	0,20
HbA1c, %	5,4 (5,0-5,7)	5,5 (5,1-5,9)	5,4 (5,1-5,7)	0,93
TBARS, µmol/mL	1,5 (0,9-2,1)	1,4 (0,9-2,0)	1,6 (0,9-2,2)	0,94
PCRs, mg/L	0,4 (0,3-0,6)	0,5 (0,3-1,0)	0,5 (0,3-1,0)	0,17

Valores expressos por medianas e interquartis. Ca⁺⁺ = cálcio ionizado; HbA1c = hemoglobina glicada; TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PCRs = proteína C reativa de alta sensibilidade.

4.4. Valores basais obtidos para os estudos de vasorreatividade

A Tabela 4 mostra que a dilatação endotélio dependente, examinada pela dilatação mediada pelo fluxo (DMF) não diferiu na condição basal entre os grupos.

Da mesma forma, não foram observadas diferenças para a dilatação vascular endotélio independente, obtida após 5 mg de dinitrato de isossorbide sublingual (DMN).

Tabela 4. Valores basais obtidos para os estudos de vasorreatividade

Parâmetro	PER N=29	HCTZ N=33	INDA N=32	p
DMF, %	7,3 (4,3-10,3)	8,3 (5,8-1,01)	6,7 (5,0-10,2)	0,83
DMN, %	11,1 (9,0-14,7)	12,6 (10,1-15,9)	13,0 (9,5-15,3)	0,76

Valores expressam medianas e interquartis. DMF = dilatação mediada pelo fluxo; DMN = dilatação mediada por nitrato.

4.5. Valores basais para anticorpos anti LDL oxidada (anti-oxLDL)

Os títulos de anticorpos anti LDL oxidada não diferiram entre os grupos na condição basal (Tabela 5).

Tabela 5. Valores basais de anticorpos da LDL oxidada por grupos de tratamento

Parâmetro	PER N=29	HCTZ N=33	INDA N=32	p
Anti-oxLDL	1,7 (1,2-2,1)	1,7 (1,3-2,5)	1,5 (1,3-2,2)	0,76

Valores expressos como medianas e interquartis. Anti-oxLDL = anticorpos anti LDL oxidada expressos em IR (índice de reatividade).

4.6. Efeitos do tratamento anti-hipertensivo na pressão arterial casual e na MAPA

O tratamento da hipertensão arterial com perindopril (PER), hidroclorotiazida (HCTZ) e indapamida (INDA) após 12 semanas reduziu a pressão arterial casual sistólica e diastólica ($p < 0,0001$ vs. basal), bem como as medidas obtidas pela MAPA ($p < 0,0001$ vs. basal), mas sem diferenças entre os tratamentos (GLM).

A Tabela 6 mostra os valores medianos e interquartis observados após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo.

Tabela 6. Pressões arteriais casuais e obtidas pela MAPA por grupos, após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo

Parâmetro	PER N=29	HCTZ N=33	INDA N=32	p
Pressões casuais				
PAS, mm Hg	135 (120-144)	131 (124-145)	140 (130-150)	0,32
PAD, mm Hg	80 (80-90)	79 (80-90)	87 (80-91)	0,71
MAPA				
PAS, mm Hg	123 (115-134)	118 (116-130)	125 (112-130)	0,15
PAD, mm Hg	81 (72-85)	75 (70-82)	73 (69-80)	0,33

Valores expressos como medianas e interquartis. Anti-oxLDL = anticorpos anti LDL oxidada. MAPA = monitorização ambulatorial da pressão arterial, dados obtidos para os valores medianos em 24 horas.

4.7. Parâmetros lipídicos obtidos após tratamento anti-hipertensivo

O tratamento anti-hipertensivo por 12 semanas não modificou os parâmetros lipídicos, mas os níveis de colesterol total permaneceram mais baixos no grupo INDA em relação ao grupo PER (GLM medidas repetidas, $p < 0,05$). Entretanto, valores mais elevados de apolipoproteína B foram observados em relação ao período basal ($p < 0,02$, GLM, medidas repetidas).

A Tabela 7 mostra os valores medianos e interquartis para os valores lipídicos obtidos 12 semanas após o tratamento anti-hipertensivo.

Tabela 7. Parâmetros lipídicos obtidos após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo

Parâmetro	PER N=29	HCTZ N=33	INDA N=32	p
Colesterol total	215 (173-243)	202 (175-229)	184 (162-211)	0,05
LDL-C	117 (95-147)	125 (96-150)	118 (91-129)	0,63
HDL-C	47 (40-57)	45 (39-60)	46 (41-62)	0,88
Triglicérides	121 (78-181)	126 (99-169)	111 (75-156)	0,39
Apo B	113 (91-129)	107 (95-119)	97 (77-111)	0,18
Apo A1	131 (122-151)	127 (111-145)	129 (110-148)	0,36

Valores expressos por medianas e interquartis em mg/dL; apo = apolipoproteína; valores de triglicérides foram log transformados. Valores de colesterol total no grupo INDA < grupo PER ($p < 0,05$, GLM medidas repetidas).

4.8. Parâmetros bioquímicos não lipídicos obtidos ao final do tratamento

A Tabela 8 contém os valores medianos e interquartis observados para parâmetros bioquímicos não lipídicos.

Os parâmetros observados ao final do tratamento não diferiram entre os grupos, mas foram observados valores mais baixos de potássio ($p < 0,005$), aumento nos valores de creatinina ($p < 0,05$), diminuição dos níveis plasmáticos de TBARS ($p < 0,05$), quando comparados aos valores basais (GLM para medidas repetidas).

Tabela 8. Parâmetros bioquímicos não lipídicos após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo

Parâmetro	PER N=29	HCTZ N=33	INDA N=32	p
Sódio, mEq/L	140 (139-141)	140 (138-143)	140 (138-141)	0,24
Potássio, mEq/L	4,0 (3,7-4,5)	3,8 (3,5-4,2)	3,9 (3,5-4,1)	0,11
Ca ⁺⁺ , mmol/L	1,2 (1,1-1,2)	1,1 (1,1-1,2)	1,1 (1,1-1,2)	0,53
Creatinina, mg/dL	0,9 (0,8-1,1)	0,9 (0,8-1,1)	1,0 (0,9-1,1)	0,42
Glicose, mg/dL	88 (83-101)	92 (84-104)	89 (78-98)	0,29
HbA1c, %	5,5 (5,1-5,9)	5,5 (4,9-6,1)	5,5 (5,3-5,9)	0,98
TBARS, µmol/mL	1,3 (0,9-1,8)	1,4 (0,9-2,0)	1,3 (0,9-1,7)	0,60
PCRas, mg/L	0,4 (0,3-0,6)	0,4 (0,3-0,9)	0,4 (0,2-0,5)	0,12

Valores expressos por medianas e interquartis em mg/dL; ca⁺⁺ = cálcio ionizado; HbA1c = hemoglobina glicada; TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PCRas = proteína C reativa de alta sensibilidade.

4.9. Modificações na vasorreatividade de acordo com o tratamento anti-hipertensivo

A Figura 1 mostra a significativa melhora na função endotelial, estimada pela DMF, com o tratamento anti-hipertensivo, sem diferenças pela terapia específica instituída.

A dilatação independente do endotélio, estimada pela dilatação vascular após nitrato (DMN) mostrou tendência para maiores valores ao final do tratamento, mas sem diferenças pelo tratamento anti-hipertensivo instituído (Figura 2).

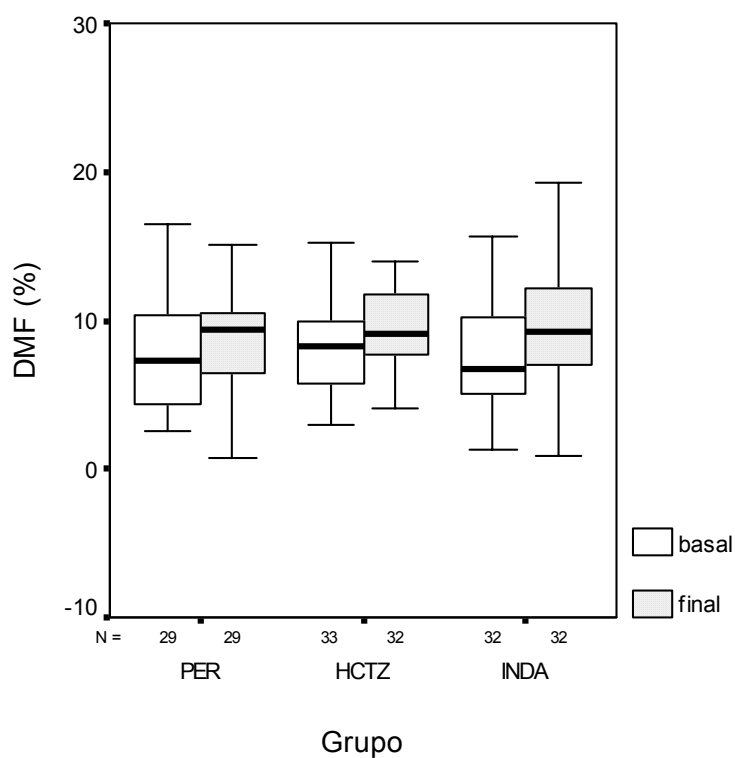


Figura 1. Dilatação mediada pelo fluxo (DMF) de acordo com o tratamento anti-hipertensivo no período basal e ao final de 12 semanas.

Box-plots da dilatação percentual mediada pelo fluxo (DMF) no período basal e após tratamento. A DMF aumentou após 12 semanas do tratamento, sem diferenças entre os grupos ($p < 0,0005$ vs. basal, GLM para medidas repetidas).

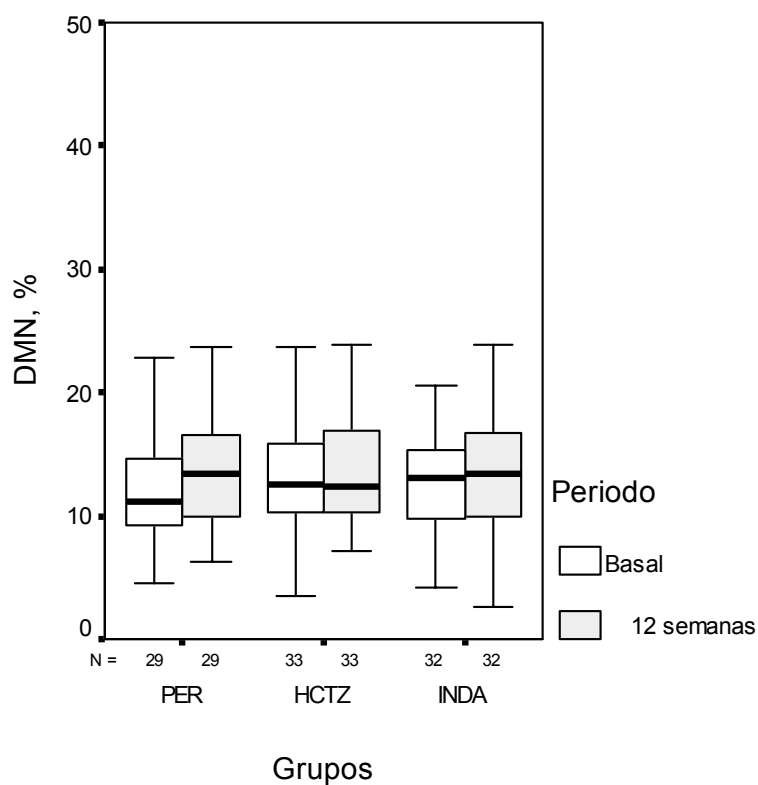


Figura 2. Dilatação vascular independente do endotélio (DMN) por tratamento anti-hipertensivo

Box-plots da dilatação percentual obtida após dinitrato de isossorbida no período basal e após tratamento. A dilatação independente do endotélio, estimada pela vasorreatividade após nitrato sublingual não foi modificada pelo tratamento anti-hipertensivo instituído ($p=0,99$ entre grupos; $p=0,09$ basal vs. final).

4.10. Efeitos do tratamento anti-hipertensivo nos títulos de anticorpos para LDL oxidada

A terapia anti-hipertensiva se acompanhou de aumento nos títulos de anticorpos para a LDL oxidada (anti LDLox), mas não houve diferenças entre os tratamentos instituídos (Figura 3).

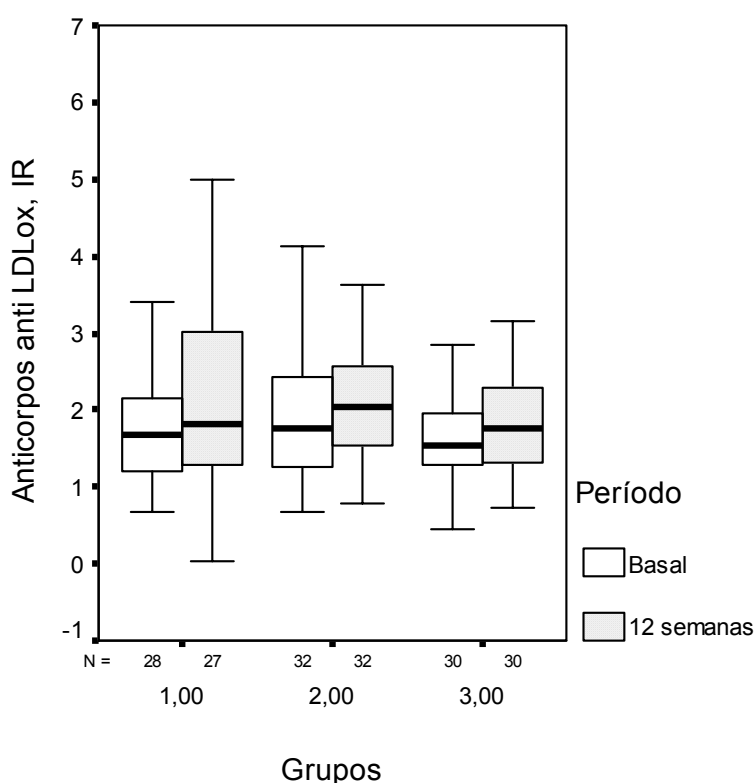


Figura 3. Títulos de anticorpos anti-LDL oxidada no período basal e após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo

Box-plots para os anticorpos anti-LDL oxidada mensurados no basal e após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo, expressos em IR (índice de reatividade). Valores com 12 semanas > valores basais ($p < 0,005$, GLM dados repetidos), mas sem diferenças entre os tratamentos instituídos ($p = 0,37$, GLM dados repetidos).

4.11. Correlações com anticorpos anti LDL oxidada

Na condição basal, dentre todas as variáveis analisadas, observamos correlação positiva entre os títulos de anticorpos anti LDL oxidada com a idade e valores obtidos para a pressão arterial sistólica casual (sentado), e correlação negativa com o peso, índice de massa corpórea e circunferência abdominal (Tabela 9).

Ao final do tratamento, observamos correlação positiva dos anticorpos da LDL oxidada com a idade e apolipoproteína A1 e correlação negativa com índice de massa corpórea, circunferência abdominal e frequência cardíaca obtida pela MAPA nas 24 horas e no período vigil (Tabela 10). De forma interessante, não observamos correlação com a dilatação mediada pelo fluxo ou com os valores de TBARS, nem na condição basal ou ao final do tratamento (Tabela 10).

Tabela 9. Correlações com anticorpos anti LDL oxidada no basal.

Parâmetro	correlação	p
Idade	0,284	0,007
Índice de massa corpórea	- 0,252	0,017
Circunferência abdominal	- 0,246	0,020
Cálcio ionizado	- 0,260	0,014
Glicose 2h pós TOTG	0,244	0,020
Proteína C Reativa alta sensibilidade	- 0,213	0,044

Correlações obtidas pelo teste de Pearson.

Tabela 10. Correlações com anticorpos anti LDL oxidada após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo.

Parâmetro	correlação	P
Idade	0,286	0,007
Índice de massa corpórea	- 0,290	0,006
Apolipoproteína A 1	0,231	0,032
Frequência cardíaca 24h MAPA	- 0,237	0,041
Frequência cardíaca vigil MAPA	- 0,257	0,026

Correlações obtidas pelo teste de Pearson.

4.12. Regressão linear para os anticorpos anti LDL oxidada

No período basal, as variáveis que fizeram parte de nosso modelo foram: idade, índice de massa corpórea (IMC), cálcio ionizado, glicemia de 120 minutos após teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e proteína C reativa de alta sensibilidade (PCRas) todos correlacionadas na análise univariada.

Em nosso modelo de regressão linear, permaneceram significativamente associadas com os títulos de anticorpos anti LDL oxidada (variável dependente) as seguintes variáveis: IMC, cálcio ionizado e glicose de 120 minutos (TOTG) (Tabela 11).

Tabela 11. Regressão linear para os títulos de anticorpos anti LDL oxidada no basal

Parâmetro	Coefficiente beta	P
IMC	- 0,056	0,006
Cálcio ionizado	- 1,612	0,018
Glicose 120 minutos	0,004	0,034

Regressão linear $p < 0,0001$. Coeficientes obtidos para os títulos de anticorpos anti LDL oxidada na condição basal.

Tabela 12. Regressão linear para os títulos de anticorpos anti LDL oxidada após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo

Parâmetro	Coeficiente beta	P
IMC	- 0,065	0,001
FC Vigil (MAPA)	- 0,091	0,045

Regressão linear $p < 0,001$. Coeficientes obtidos para os títulos de anticorpos anti LDL oxidada na condição de 12 semanas após tratamento anti-hipertensivo.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A principal contribuição deste estudo foi a de mostrar um precoce aumento nos títulos de anticorpos anti-LDL oxidada decorrente do tratamento da hipertensão arterial.

A hipertensão arterial constitui a principal causa de morte em todo o mundo e notadamente em nosso país⁷². Entretanto, a verdadeira base fisiopatológica para a ocorrência destas mortes decorre de complicações aterotrombóticas nestes pacientes, tanto coronarianas como cerebrovasculares⁷³.

Neste sentido, nosso estudo mostrou que a hipertensão arterial, mesmo em estágio inicial, sem outros fatores de risco clássicos, como hipercolesterolemia, diabetes *mellitus* ou tabagismo está associada com modificações oxidativas da LDL, que determinam por sua vez a formação de anticorpos para estas lipoproteínas modificadas.

Com o controle pressórico, baseado no uso de diuréticos tiazídicos ou de inibidor da enzima conversora da angiotensina, notamos um aumento significativo nos títulos destes anticorpos, sugerindo menor consumo dos mesmos.

Hoje a teoria moderna da aterosclerose inclui modificação oxidativa principalmente da LDL, determinando respostas inflamatórias e imunes que caracterizam a formação e deposição de imunocomplexos na íntima vascular⁷⁴.

As LDLs modificadas formam complexos que incluem anticorpos anti-LDL oxidada e outras proteínas inflamatórias, como a proteína C reativa⁷⁵.

Assim, a hipertensão tem sido descrita como uma condição inflamatória,

sendo os aumentos dos níveis de pressão arterial associados de forma progressiva com aumento nos títulos de marcadores inflamatórios como a proteína C reativa de alta sensibilidade^{57,58,76}. De forma interessante, este aumento na prevalência de valores aumentados da proteína C reativa já são maiores desde o estágio pré-hipertensivo⁵⁸. De fato, nesse estudo demonstrou-se que mesmo em pacientes normotensos, o desenvolvimento da hipertensão arterial ao longo do tempo foi associado a aumento dos títulos de proteína C reativa na condição basal.

Nosso estudo focalizou novos aspectos da resposta imune. Mostramos que o controle da pressão arterial, pela MAPA e pela pressão casual foi associado a modificações dos títulos de anticorpos da LDL oxidada. É possível que o aumento destes títulos, precocemente observado (três meses) possa refletir o menor consumo dos mesmos na formação de imunocomplexos a serem depositados na íntima vascular, pela menor oxidação de lipoproteínas.

De fato, observamos declínio nos níveis plasmáticos de TBARS, sugerindo diminuição da peroxidação lipídica. Ao mesmo tempo, verificamos que o relaxamento dependente do endotélio, baseado nos estudos de dilatação mediada pelo fluxo, também apresentou significativa melhora, confirmando que este aumento nos títulos de anticorpos esteja associado a uma condição clínica mais saudável.

De forma conjunta, postulamos que a medida dos anticorpos da LDL oxidada possa se constituir em um novo marcador bioquímico da efetividade de nossa intervenção durante o controle da pressão arterial. Isto constitui uma nova visão da doença hipertensiva, baseada não apenas na redução dos mm Hg, mas

no controle do estado oxidativo da LDL, possivelmente um fator crucial da aterosclerose e desfechos cardiovasculares associados à hipertensão arterial.

O estudo descortina outras importantes observações, como os efeitos do tratamento com diferentes agentes anti-hipertensivos, mostrando que nestes pacientes, sem outras co-morbidades associadas, o controle da pressão *per se* pareceu suficiente para modificar o estado imune de anticorpos da LDL oxidada, de forma independente à escolha do agente anti-hipertensivo inicial, seja um diurético tiazídico, ou um bloqueador do sistema renina angiotensina. É possível que para outros subgrupos de pacientes, como os portadores de diabetes *mellitus* ou de síndrome metabólica, os bloqueadores do sistema renina angiotensina possam ser mais eficientes pelo maior espectro de benefícios metabólicos, mas nos pacientes do estudo, sem estas condições, o controle pressórico *per se* foi o principal determinante do benefício, não apenas na resposta imune, mas na diminuição dos títulos de TBARS ou para a melhora da função endotelial.

A presença de hipertensão arterial determina ativação de uma cascata de estímulos inflamatórios, os quais se associam a geração de espécies reativas de oxigênio, que determinam oxidação da LDL⁷⁶, levando a captação destas pelos macrófagos. A degradação da partícula constitui um estímulo imunoestimulatório, imunogênico e estimula a produção de anticorpos circulantes que podem ser mensurados no plasma. Assim, quantificamos estes anticorpos livres, ainda não complexados com a LDL oxidada ou com outras proteínas como a proteína C reativa^{61-67, 77-79}.

Com o declínio da pressão arterial, existe redução destes estímulos inflamatórios para a oxidação da LDL.

Outra característica do estudo foi a criteriosa seleção dos pacientes. Para testarmos nossa hipótese de resoste imune adaptativa induzida pelo estado hipertensivo seria importante contarmos com pacientes sem uso atual de medicamentos. Neste sentido fomos além, pois não apenas os pacientes não estavam em uso de anti-hipertensivos, mas aproximadamente a metade não havia feito uso prévio deste tipo de medicação. Além disso, por excluirmos tabagistas, diabéticos ou dislipidêmicos, eliminamos fatores de confusão na interpretação de resultados. Estes aspectos foram elogiados quando da submissão de nosso estudo aos revisores do *American Journal of Hypertension* que consideraram a inclusão de pacientes com estas características da maior relevância para valorização dos achados obtidos.

Quais as implicações de nosso estudo?

A visão moderna da aterosclerose sugere que de forma relativamente independente aos fatores de risco presentes, seu desenvolvimento depende de um processo inflamatório, caracterizado no início pelo recrutamento de monócitos, sua diferenciação em células inflamatórias na íntima vascular, onde com intensidade variável adquire um fenótipo de sinalização celular pró-inflamatório associado com formação de regiões vasculares de maior potencial para complicações aterotrombóticas, as chamadas placas vulneráveis⁸⁰. O que se discute é a associação da intensidade do processo inflamatório com o descontrole de fatores de risco, entre os quais a hipertensão arterial.

É inegável que alguns agentes farmacológicos, principalmente bloqueadores do receptor tipo 1 da angiotensina II ou dos inibidores da enzima

conversora da angiotensina, pelos efeitos não relacionados diretamente à redução da pressão arterial, como a diminuição do estresse oxidativo, melhora da biodisponibilidade de óxido nítrico ou pela redução de marcadores inflamatórios, possam ser de grande valor para pacientes hipertensos, sobretudo aqueles com maior intensidades destes fatores associados ao desenvolvimento da aterosclerose, principalmente em longo prazo. Entretanto, verificamos que o tratamento iniciado com hidroclorotiazida, indapamida ou perindopril, apresentaram resultados similares na resposta imune, melhora da função endotelial ou em marcador de peroxidação lipídica, como também foram semelhantes nas medidas de pressão arterial casual ou obtidas pela MAPA. Isto mostra que um importante benefício é alcançado simplesmente pelo melhor controle da pressão arterial. E mais, o estudo sugere que benefícios em longo prazo possam ser alcançados pela redução do consumo de anticorpos, refletindo que a hipertensão arterial seja uma condição que deflagra resposta imune e que estes anticorpos possam sinalizar mecanismos compensatórios, benéficos na defesa de modificações oxidativas das LDL. É possível especular que o estabelecimento da hipertensão arterial, de forma progressiva contribua para modificações oxidativas da LDL e que durante certo tempo os anticorpos gerados possam ser benéficos, determinando a formação de complexos imunes que sejam depurados da circulação. Todavia, com o desenvolvimento franco da doença hipertensiva, os estímulos podem ser de tal monta que esta formação acelerada destes complexos imunes acabe determinando maior deposição na íntima vascular, contribuindo para a aceleração da aterosclerose no paciente hipertenso.

Assim, com o controle efetivo da hipertensão arterial, como em nosso

estudo pelo ajuste da medicação após seis semanas de terapia inicial, este maior controle possivelmente resulte em menor consumo de anticorpos pela menor formação de LDL oxidadas, o que pode ser sugerido pela redução dos títulos de TBARS. Com o tempo, é possível que a redução do estímulo à formação de anticorpos resulte em queda adicional nos títulos deste marcador, mas seria necessária a manutenção de adequado controle pressórico em longo prazo. De fato, Shoenfeld *et al*⁸¹, demonstraram que estes complexos circulantes não são deletérios, mas seus efeitos apenas aparecem quando depositados em tecidos.

Desta forma, nossa principal contribuição foi a de estabelecer um novo elo entre a hipertensão arterial, seu tratamento e a resposta inflamatória imune-mediada.

Limitações

Nosso estudo avaliou os efeitos da terapia anti-hipertensiva em período relativamente precoce em pacientes em estágio 1 da hipertensão arterial. Os efeitos da doença hipertensiva e seu controle em estágios mais avançados da doença não foram examinados. Da mesma forma, não foram avaliados os efeitos do tratamento na presença de comorbidades como insuficiência renal, insuficiência cardíaca, ou na presença de outros fatores de risco clássicos como tabagismo, hipercolesterolemia ou diabetes, como também não incluímos pacientes de alto risco ou em prevenção secundária da aterosclerose. Todos estes aspectos constituirão áreas de interesse para melhor exame do tratamento da hipertensão arterial e de benefícios de uma terapia específica para alguns destes subgrupos de pacientes e constituirão novos aspectos a serem examinados em

futuro próximo.

De forma interessante, embora o aumento dos títulos de anticorpos tenha ocorrido em paralelo a diminuição da pressão arterial, redução de títulos de TBARS e melhora da função endotelial, não encontramos correlações significantes entre estas variáveis, seja na condição basal ou ao final do estudo. Mas este aspecto surpreendente também encontra paralelo nos estudos de intervenção hipolipemiante com estatinas, onde a redução de LDL não se correlacionou de maneira significativa à redução de proteína C reativa de alta sensibilidade, seja em valores absolutos ou percentuais, mas ambos foram associados a marcante redução de desfechos cardiovasculares ⁸².

Perspectivas futuras

Este estudo amplia a importância da hipertensão arterial como doença complexa, reafirmando por um lado conceitos atuais que valorizam o melhor controle pressórico, mas de outro permite uma nova visão da doença, possibilitando que os efeitos de seu tratamento sejam examinados em um contexto não restrito aos mm Hg, mas envolvendo a resposta imune. Propomos que os títulos de anticorpos possam se constituir em metas terapêuticas na hipertensão arterial, o que deverá ser examinado em situações já mencionadas de maior complexidade. Se os resultados se mostrarem uniformes uma próxima etapa seria o desenvolvimento tecnológico que permitisse com maior facilidade o acesso a estas determinações, hoje ainda relativamente complexas e demandando intenso trabalho desde a separação das lipoproteínas à determinação de anticorpos por ELISA.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Gerais

O tratamento anti-hipertensivo determinou redução da peroxidação lipídica, melhora da função endotelial e modificou a resposta imune à LDL oxidada.

Específicos

O perfil lipídico foi discretamente alterado pelo tratamento, observando-se aumento nos níveis de apolipoproteína B, diminuição de potássio e aumento de creatinina, todos de pequena magnitude e sem diferenças entre os tratamentos baseados em perindopril, hidroclorotiazida ou indapamida.

Observamos aumento no título de anticorpos para a LDL oxidada ao final do tratamento, sem diferenças entre os grupos. Este aumento de anticorpos ocorreu em paralelo ao melhor controle pressórico, diminuição de TBARS e melhora da vasodilatação mediada pelo fluxo, embora não tenha havido correlações significativas entre estas variáveis, tanto na condição basal como ao final do estudo. Entretanto, baixas correlações foram obtidas tanto no período basal como após o tratamento, com algumas variáveis laboratoriais e clínicas, sendo mais consistente a associação com o índice de massa corpórea.

7. REFERÊNCIAS

Referências bibliográficas

1. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, for the Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002;360:1903–13.
2. Corrêa TD, Namura JJ, Silva CAP, Castro MG, Meneghini A, Ferreira C. Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Arq Med ABC* 2006;31:91-101.
3. Ministério da Saúde. URL:<http://www.datasus.gov>. Acessado em 28 de outubro de 2009.
4. Gus I, Harzheim E, Zaslavsky C, Medina C, Gus M. Prevalence, Awareness, and Control of Systemic Arterial Hypertension in the State of Rio Grande do Sul. *Arq Bras Cardiol* 2004;83:429-33.
5. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *JAMA* 2003;289:2560-72.

6. Sociedade Brasileira de Cardiologia-SBC; Sociedade Brasileira de Hipertensão-SBH; Sociedade Brasileira de Nefrologia-SBN. V Brazilian Guidelines in Arterial Hypertension. *Arq Bras Cardiol* 2007;89:e24-79.
7. Lotufo PA, Bensenor IM. Stroke mortality in São Paulo (1997-2003), a description using the Tenth Revision of the International Classification of Diseases, *Arq Neuropsiquiatr* 2004;62:1008-11.
8. Olesen J, Leonardi M. The burden of brain diseases in Europe. *Eur J Neurol* 2003;10:471-7.
9. MMWR. Self-reported heart disease and stroke among adults with and without diabetes-United States, 1999-2001. *Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:1065-6.
10. MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part I. Prolonged differences in blood pressure: Prospective observation studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990;335:764-74
11. Truelsen T, Lindenstrom E, Boysen G. Comparison of probability of stroke between the Copenhagen City Heart Study and the Framingham Study. *Stroke* 1994;25:802-7.
12. Taxas de mortalidade por causas selecionadas de doenças do aparelho circulatório. Ministério da Saúde/DATASUS.1999.

13. Mitani H, Bandoh T, Kimura M, Totsuka T, Hayashi S: Increased activity of vascular ACE related to atherosclerotic lesions in hyperlipidemic rabbits. *Am J Physiol* 1996;271:H1065-71.
14. Hoshida S, Nishida M, Yamashita N, Igarashi J, Aoki K, Hori M, et al. Vascular angiotensin-converting enzyme activity in cholesterol-fed rabbits: effects of enalapril. *Atherosclerosis* 1997;130:53-9.
15. Penschow JD, Bulmer B. Effects of diuretics on renal kallikrein gene expression in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1998;25:S86-90.
16. Vergely C, Walker MK, Zeller M, Rademakers JR, Maupoil V, Schiavi P, et al. Antioxidant properties of indapamide, 5-OH indapamide and hydrochlorothiazide evaluated by oxygen-radical absorbing capacity and electron paramagnetic resonance. *Mol Cell Biochem* 1998;178:151-5.
17. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342:145-53.
18. PROGRESS Collaborative Group. Randomized trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet* 2001;358:1033-41.

19. Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 2003;362:782-8.
20. Devereux RB, Dahlof B, Kjeldsen SE, Julius S, Aurup P, Beevers G, et al. Effects of losartan or atenolol in hypertensive patients without clinically evident vascular disease: a substudy of the LIFE randomized trial. *Ann Intern Med* 2003;139:169-77.
21. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-97.
22. ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA* 2002;288:2981-97.
23. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 2001; 37:1053-9.
24. Fonseca FA, Ihara SS, Izar MC, Silva EP, Kasinski N, Lopes IE, et al. Hydrochlorothiazide abolishes the anti-atherosclerotic effect of quinapril. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:779-85.

25. Pomaro DR, Ihara SS, Pinto LE, Ueda I, Casarini DE, Ebihara F, et al. High glucose levels abolish antiatherosclerotic benefits of ACE inhibition in alloxan-induced diabetes in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;45:295-300.
26. Rubanyi GM: The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22 Suppl 4:S1-14.
27. Kjeldsen SE, Jamerson KA, Bakris GL, Pitt B, Dahlof B, Velazquez EJ, et al. Predictors of blood pressure response to intensified and fixed combination treatment of hypertension: the ACCOMPLISH study. *Blood Press* 2008;17:7-17.
28. Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, et al. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88(Suppl 1):2-19.
29. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002;288:2709-16.
30. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet* 2005;366:1059-62.
31. Ribeiro-Oliveira Jr A, Nogueira AI, Pereira RM, Vilas Boas WW, Dos Santos RAS, Silva ACS. The renin–angiotensin system and diabetes: An update. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4:787–803.

32. Tikellis C, Wookey PJ, Candido R, Andrikopoulos S, Thomas MC, Cooper ME: Improved islet morphology after blockade of the renin- angiotensin system in the ZDF rat. *Diabetes* 2004,53:989-97.
33. Savoia C, Schiffrin EL. Reduction of C-reactive protein and the use of anti-hypertensives. *Vasc Health Risk Manag* 2007;3:975–83.
34. Tuñón J, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tarín N, Egido J. Common pathways of hypercholesterolemia and hypertension leading to atherothrombosis: the need for a global approach in the management of cardiovascular risk factors. *Vasc Health Risk Manag* 2007;3:521–6.
35. King DE, Egan BM, Mainous AG, 3rd, Geesey ME. Elevation of C-reactive protein in people with prehypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2004;6:562-8.
36. Dauphinot V, Roche F, Kossovsky MP, Schott AM, Pichot V, Gaspoz JM, et al. C-reactive protein implications in new-onset hypertension in a healthy population initially aged 65 years: the Proof study. *J Hypertens* 2009, 27:736-43.
37. Camici GG, Sudano I, Noll G, Tanner FC, Luscher TF. Molecular pathways of aging and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:134-137.
38. Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989;264:2599-604.

39. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;13:341-90.
40. Kannel WB. Hazards, risks, and threats of heart disease from the early stages to symptomatic coronary heart disease and cardiac failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997;11 Suppl 1:199-212.
41. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141:1-15.
42. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986;246:501-14.
43. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984; 105:273-282.
44. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2995-8.
45. Steinberg D. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* 1987;76:508-14.

46. Chang YH, Abdalla DS, Sevanian A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 1997;23:202-14.
47. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3893-7.
48. Zhou X, Hansson GK. Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice. *Scand J Immunol* 1999;50:25-30.
49. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
50. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-62.
51. Nilsson J, Fredrikson GN, Bjorkbacka H, Chyu KY, Shah PK: Vaccines modulating lipoprotein autoimmunity as a possible future therapy for cardiovascular disease. *J Intern Med* 2009;266:221-31.
52. Sherer Y, Shoenfeld Y. Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 2002;1:21-7.

53. Parums DV, Brown DL, Mitchinson MJ. Serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein and ceroid in chronic periaortitis. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:383-7.
54. Nilsson J, Kovanen PT: Will autoantibodies help to determine severity and progression of atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol* 2004;15:499-503.
55. Stefanutti C, Di Giacomo S, Vivencio A, Isacchi GC, Masella R, Caprari P, et al. Acute and long-term effects of low-density lipoprotein (LDL)-apheresis on oxidative damage to LDL and reducing capacity of erythrocytes in patients with severe familial hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:191-8.
56. Meroni PL, Ronda N, De Angelis V, Grossi C, Raschi E, Borghi MO. Role of anti-beta2 glycoprotein I antibodies in antiphospholipid syndrome: in vitro and in vivo studies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007;32:67-74.
57. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: from concept to clinical practice to clinical benefit. *Am Heart J* 2004;148:S19-26.
58. Tsimikas S, Willerson JT, Ridker PM. C-reactive protein and other emerging blood biomarkers to optimize risk stratification of vulnerable patients. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:C19-31.
59. Staessen JA, Beilin L, Parati G, Waeber B, White W. Task force IV: Clinical use of ambulatory blood pressure monitoring. Participants of the 1999 Consensus Conference on Ambulatory Blood Pressure Monitoring. *Blood Press Monit* 1999;4:319-31.

60. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
61. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
62. Ketelhuth DF, Tonini GC, Carvalho MD, Ramos RF, Boschcov P, Gidlund M. Autoantibody response to chromatographic fractions from oxidized LDL in unstable angina patients and healthy controls. *Scand J Immunol* 2008; 68:456-62.
63. Fernvik EC, Ketelhuth DFJ, Russo M, Gidlund M. The autoantibody repertoire against copper- or macrophage-modified LDL differs in normolipidemics and hypercholesterolemic patients. *J Clin Immunol* 2004;24:170-6.
64. Gidlund M, Damasceno NR, Lindoso JA, Abdalla DS, Goto H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with various degrees of oxidative modifications. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:1625-8.
65. Zaratin A, Gidlund M, Boschcov P, Castilho L, de Faria EC. Antibodies against oxidized low-density lipoprotein in normolipidemic smokers. *Am J Cardiol* 2002;90:651-653.

66. Uint L, Gebara OC, Pinto LB, Wajngarten M, Boschcov P, da Luz PL, Gidlund M. Hormone replacement therapy increases levels of antibodies against heat shock protein and certain species of oxidized low density lipoprotein. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:491-4.

67. Damasceno NR, Goto H, Rodrigues FM, Dias CT, Okawabata FS, Abdalla DS, Gidlund M. Soy protein isolate reduces the oxidizability of LDL and the generation of oxidized LDL autoantibodies in rabbits with diet-induced atherosclerosis. *J Nutr* 2000;130:2641-7.

68. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257-65.

69. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry*. San Francisco, W H Freeman and Company, 1969.

70. Siegel S, Castellan JR. *Non Parametric Statistics - 2º Ed*. McGraw-Hill. N York, Int Ed, 1988.

71. Draper NR, Smith H. *Applied Regression Analysis. 3rd*. N York, Wiley, 1966.

72. Rodriguez T, Malvezzi M, Chatenoud L, Bosetti C, Levi F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from coronary heart and cerebrovascular diseases in the Americas: 1970-2000. *Heart* 2006;92:453-60.
73. Libby P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med* 2008;263:517-27.
74. Lopez LR, Buckner TR, Hurley BL, Kobayashi K, Matsuura E. Determination of oxidized low-density lipoproteins (ox-LDL) versus ox-LDL/beta2GPI complexes for the assessment of autoimmune-mediated atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:303-10.
75. Matsuura E, Kobayashi K, Tabuchi M, Lopez LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 2006;45:466-86.
76. Keidar S, Kaplan M, Shapira C, Brook JG, Aviram M. Low density lipoprotein isolated from patients with essential hypertension exhibits increased propensity for oxidation and enhanced uptake by macrophages: a possible role for angiotensin II. *Atherosclerosis* 1994;107:71-84.
77. Maggi E, Marchesi E, Ravetta V, Martignoni A, Finardi G, Bellomo G. Presence of autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein in essential hypertension: a biochemical signature of an enhanced in vivo low-density lipoprotein oxidation. *J Hypertens* 1995;13:129-38.

78. Lopez D, Kobayashi K, Merrill JT, Matsuura E, Lopez LR. IgG autoantibodies against beta2-glycoprotein I complexed with a lipid ligand derived from oxidized low-density lipoprotein are associated with arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Clin Dev Immunol* 2003;10:203-11.

79. Santos AO, Fonseca FA, Fischer SM, Monteiro CM, Brandao SA, Pova RM, et al. High circulating autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein are related to stable and lower titers to unstable clinical situation. *Clin Chim Acta* 2009;406:113-8.

80. Thim T, Hagensen MK, Bentzon JF, Falk E. From vulnerable plaque to atherothrombosis. *J Intern Med* 2008;263:506-16.

81. Shoenfeld Y, Wu R, Dearing LD, Matsuura E. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective? *Circulation* 2004, 110:2552-8.

82. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet* 2009;373:1175-82.

8. ANEXOS

Early Increase in Autoantibodies Against Human Oxidized Low-Density Lipoprotein in Hypertensive Patients After Blood Pressure Control

[Q1] S.A. Brandão¹, Maria Cristina de Oliveira Izar¹, S.M. Fischer¹, A.O. Santos¹, C.M. Monteiro¹, R.M. Póvoa¹, T. Helfenstein¹, A.C. Carvalho¹, A.M. Monteiro², E. Ramos², M. Gidlund², A.M. Figueiredo Neto³ and F.A. Fonseca³

[Q2] BACKGROUND

Oxidized lipoproteins and antioxidantized low-density lipoprotein (anti-oxLDL) antibodies (Abs) have been detected in plasma in response to blood pressure (BP) elevation, suggesting the participation of the adaptive immune system. Therefore, treatment of hypertension may act on the immune response by decreasing oxidation stimuli. However, this issue has not been addressed. Thus, we have here analyzed anti-oxLDL Abs in untreated (naive) hypertensive patients shortly after initiation of antihypertensive therapeutic regimens.

METHODS

Titers of anti-oxLDL Abs were measured in subjects with recently diagnosed hypertension on stage 1 ($n = 94$), in primary prevention of coronary disease, with no other risk factors, and naive of antihypertensive medication at entry. Subjects were randomly assigned to receive perindopril, hydrochlorothiazide (HCTZ), or indapamide (INDA) for 12 weeks, with additional perindopril if necessary to achieve BP control. Abs against copper-oxidized LDL were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

RESULTS

Twelve-week antihypertensive treatment reduced both office-based and 24-h ambulatory BP measurements ($P < 0.0005$). The decrease in BP was accompanied by reduction in thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) ($P < 0.05$), increase in anti-oxLDL Ab titers ($P < 0.005$), and improvement in flow-mediated dilation (FMD) ($P < 0.0005$), independently of treatment. Although BP was reduced, we observed favorable changes in anti-oxLDL titers and FMD.

CONCLUSIONS

We observed that anti-oxLDL Ab titers increase after antihypertensive therapy in primary prevention when achieving BP targets. Our results are in agreement with the concept that propensity to oxidation is increased by essential hypertension and anti-oxLDL Abs may be protective and potential biomarkers for the follow-up of hypertension treatment.

Keywords: angiotensin-converting enzyme inhibitor; antibodies; blood pressure; diuretic; hypertension; oxidized LDL

Am J Hypertens 2009; **xx**:xxx-xxx © 2009 American Journal of Hypertension, Ltd.

Hypertension affects ~50 million people in the United States, and up to 60% of the adult population is either prehypertensive or hypertensive.^{1,2} Hypertension is considered an inflammatory disease and several studies suggested that the adaptive immune system contributes to blood pressure (BP) elevation.³⁻⁵ Data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey showed that C-reactive protein (CRP) and systolic BP (SBP) were positively associated since the prehypertensive stage.⁶ In fact, low-grade inflammation in vascular tissue contributes to the pathophysiology of hypertension. Guzik *et al.*⁴ reported that T cells modulate BP elevation caused by angiotensin II

and in response to sodium and volume challenges, by activating perivascular fat, which releases cytokines that promote vasoconstriction.⁵

Hypertension is a known risk factor for atherosclerosis, and acts promoting, facilitating, or permitting the oxidation of low-density lipoprotein (LDL).⁷ LDL from hypertensive patients is more susceptible to oxidation *in vitro*, is more promptly oxidized *in vivo*,⁸ and antibodies (Abs) against modified LDL (antioxidized LDL (anti-oxLDL) Abs) could be a suitable index of *in vivo* LDL oxidation.⁹ This increased susceptibility could be secondary to angiotensin II stimulation.¹⁰ LDL particle can be modified by oxidation, aggregation, or glycosylation, followed by additional changes by enzyme activity leading to a complete disintegration of the particle, where residues can be identified in plasma.^{11,12} Oxidized LDL expresses antigenic epitopes that elicit an immune response.⁹ Oxidized lipoproteins and anti-oxLDL Abs have been detected in human plasma and atheromas of patients with coronary atherosclerosis,¹³⁻¹⁵ in hypertensive individuals⁹ and in

¹Cardiology Division, Department of Medicine, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; ²Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; ³Complex Fluids Laboratory, Institute of Physics, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. Correspondence: Maria Cristina de Oliveira Izar (mcoizar@terra.com.br)

Received 2 August 2009; first decision 12 September 2009; accepted 14 October 2009; advance online publication 00 Month 2009. doi:10.1038/ajh.2009.214

© 2009 American Journal of Hypertension, Ltd.

apparently healthy controls.¹⁶ It is not yet known whether these Abs are only an indication of the oxidative status of LDL or whether they contribute to atherogenesis. Thus, there is controversy regarding the protective or pathogenic role of these circulating autoantibodies.¹⁷ Ketelhuth *et al.* investigated the Ab repertoire to oxLDL subfractions and observed higher titers in stable than in unstable patients.¹⁶ We have previously shown that anti-oxLDL Ab titers were higher in untreated patients with hypertension, as compared to those after a recent acute coronary syndrome, and hypothesized that the mechanism could be related to consumption or diminished Ab production due to the acute inflammatory state.¹⁸

Here we evaluate the effects of BP lowering with different antihypertensive agents on anti-oxLDL Abs. Although there are several reports on the level of Abs related to hypertension, the effect of antihypertensive treatments on the immune response is not completely explored.^{19–24} Therefore, based on the concept that there is a relationship between inflammation and hypertension and that immune mechanisms can be protective,^{17,25,26} the immune response may be useful in preventing or treating this disease. In addition, it will further strengthen the causal link between immune mechanisms and coronary disease. We hypothesized that BP control dramatically changes the levels of anti-oxLDL Abs suggesting that it could be used both as a marker for follow-up and as a potential secondary treatment.

METHODS

Patients. Ninety-four middle-aged individuals of both genders, with recently diagnosed arterial hypertension on stage 1 (ref.²) were included in the protocol. Hypertension was defined as the average of three measurements of sitting BP ≥ 140 mm Hg for SBP and/or ≥ 90 mm Hg for diastolic BP (DBP), obtained after a 5-min resting period and repeated at 5-min intervals. White coat hypertension was ruled out by 24-h ambulatory BP monitoring (ABPM) showing at least one measure (mean of 24-h SBP or DBP) above the normal range.²⁷

Study design. This is a prospective intervention trial of hypertensive subjects, naive of antihypertensive treatment at entry, randomly assigned to receive perindopril 4 mg angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI group), hydrochlorothiazide 25 mg (HCTZ group), or indapamide 1.5 mg (INDA group) for 12 weeks in a blinded-fashion. If BP goal at 6 weeks was not achieved, the patients of each therapeutic arm received addition of perindopril (4 mg) for the following 6 weeks. Drugs were coded and encapsulated before randomization and investigators were unaware of patients' treatment arm.

Presence of other risk factors, such as smoking or diabetes or, some treatment for them, hormone replacement therapy, renal or hepatic dysfunction, any active inflammatory or infectious disease was exclusion criteria.

This project was conducted at the Federal University of Sao Paulo, was approved by the local ethics committee and informed consent was obtained from all patients prior to protocol initiation.

Clinical parameters. Demographic and anthropometric data were collected at baseline and end of study. A 12-lead electrocardiogram was performed at entry. An intermediate visit at 6 weeks was performed to assess BP control and to add perindopril (4 mg) to those patients who were not at goal. Twenty-four-hour ABPM (Spacelabs 90207, Seattle, WA) was recorded at baseline and after 12 weeks.

Blood sample collection. Twelve-hour fasting samples were obtained for all patients at baseline and 12 weeks after treatment.

Biochemistry, serum lipids, and apolipoproteins. Electrolytes and creatinine were measured automatically, serum total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides were determined enzymatically (Opera Bayer, Germany) with LDL-cholesterol estimated by the Friedewald equation when triglycerides were < 400 mg/dl. Glucose was assessed by enzymatic method and glycated hemoglobin A_{1c} was measured using high-performance liquid chromatography. Concentrations of apolipoproteins were determined by nephelometry (Array 360 Beckmann, Germany). [Q4]

Markers of inflammation. High-sensitivity CRP was measured by nephelometry (R100 Analyser, Behringer, Germany), and plasma peroxidation was evaluated by the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay, which measures malondialdehyde.²⁸ [Q6]

Preparation of LDL and oxLDL. Blood was collected from one fasting normolipidemic blood-donor volunteer, and EDTA-plasma was obtained after centrifugation (1,000g, 4°C, for 15 min). Benzamidine (2 mmol/l), gentamicin (0.5%), chloramphenicol (0.25%), phenyl-methyl-sulfonylfluoride (0.5 mmol/l), and aprotinin (0.1 unit/ml) were added to the plasma. LDL fraction ($1.006 < d < 1.063$ g/ml) was isolated by sequential ultracentrifugation (100,000g, 4°C), using a 50Ti rotor (L-8 ultracentrifuge; Beckman Instruments, Palo Alto, CA), and thereafter dialyzed (4°C) against phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), containing EDTA (0.01%). LDL preparation was sterilized by filtration through a 0.22-mm filter (Milipore, Germany). [Q7]

To obtain oxLDL, LDL was dialyzed overnight against EDTA-free PBS, followed by incubation with CuSO₄ (2.5 mol/l per mg of LDL protein; 18 h; 37°C). The oxidation process was stopped by the addition of 1 mmol/l EDTA.²⁴ This procedure is standardized in our laboratory and results in a completely oxidized LDL, as defined by both a plateau phase in the TBARS assay and an increase in net negative charge.²⁸

Determination of anti-oxLDL Abs. To determine the Abs to copper-oxidized LDL, we used our own established assay as previously described.^{16,25} Ninety-six-well microtiter plates were coated with oxLDL (7.5 µg/ml; 50 µl per well) suspended in carbonate/bicarbonate buffer (0.1 mol/l; pH 9.6) and left for sensitization (4°C; overnight). After washing with PBS, the plate was blocked

with gelatin (3%; room temperature; 24h). Patients' serum samples (50µl) were diluted (1:400) before they were added to the wells. After incubation (2h), the plate was washed with PBS containing Tween (0.05%) and horseradish peroxidase-conjugated goat antihuman immunoglobulin G (IgG) solution (diluted 1:1,000 in PBS; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) was added. After washing, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (6.5% in dimethyl sulfoxide; Sigma), and H₂O₂ (Sigma) diluted in citrate/phosphate buffer (0.1 mol/l; 250 µl; pH 5.5) were added (room temperature) as enzyme substrate. The reaction was stopped by addition of H₂SO₄ (2 mol/l) and measured in terms of optical density ($\lambda = 450$ nm).

Because some imprecision in quantifying anti-oxLDL Abs by the enzyme-linked immunosorbent assay method may occur, IgG (10 mg/ml; purified human IgG, Pierce Protein Research Products; Thermo Scientific, Rockford, IL) and a buffer blank (PBS) were used as controls to compensate intraplate variation. Interplate imprecision in the enzyme-linked immunosorbent assay was minimized by processing all the samples in the same period, at the end of the clinical protocol. To minimize false positive results due to cross-reactivity with antigen naive epitopes, Ab titers were expressed as the index of reactivity, calculated as index of reactivity = $(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{sample blank}}) /$

$(OD_{\text{IgG}} - OD_{\text{IgG blank}})$, where IgG was used as a control. Samples were run in triplicate and the variation within the triplicates did not exceed 5% of the mean.

Endothelium-dependent and -independent vasorelaxation.

Vasoreactivity tests were performed in the morning after an overnight fast, by an experienced ultrasonographer in accordance with the Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated dilation (FMD) of the brachial artery.²⁹ An ultrasound system (Sonos 5500; Hewlett-Packard-Phillips), equipped with vascular software for two-dimensional imaging, color and spectral Doppler ultrasound modes, internal electrocardiogram monitor, and linear-array transducer (with a frequency range from 7.5 to 12.0 MHz), was used. Image acquisition, endothelial-dependent FMD, and endothelium-independent dilation with isosorbide dinitrate (5 mg; sublingual) were assessed.²⁹ The percent change in vessel diameter from the baseline value was calculated to determine FMD or endothelium-independent dilation. The intra- and intersonographer variability values were <1 and 2%, respectively.

Statistical analyses. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (17.0) for

Table 1 | Clinical characteristics of the study population at baseline and 12 weeks after antihypertensive treatment

Variables	ACEI (n = 29)		HCTZ (n = 33)		INDA (n = 32)		P (bg)	P (wg)
	Baseline	12 weeks	Baseline	12 weeks	Baseline	12 weeks		
Age (years) ^a	57.0	—	56.0	—	59.5	—	0.370	—
IQR	(49.0–62.5)		(48.0–64.0)		(50.0–66.7)			
Male gender ^b (%)	15 (51.7)	—	17 (51.5)	—	15 (46.9)	—	0.909	—
Weight (kg) ^a	76.0	—	71.7	—	72.3	—	0.751	—
IQR	(59.7–87.5)		(62.5–80.7)		(61.2–83.5)			
BMI (kg/m ²) ^a	27.0	—	27.0	—	28.3	—	0.837	—
IQR	(24.9–32.1)		(25.6–31.6)		(24.2–32.2)			
Waist circumference (cm) ^a	95.0	—	94.0	—	96.0	—	0.666	—
IQR	(86.5–106.5)		(85.0–100.5)		(88.0–106.0)			
HR (bpm) ^c	80.0	78.0	78	74.0	78	74.0	0.586	0.134
IQR	(72.0–87.0)	(72.0–78.7)	(68–81)	(69.0–82.0)	(74–86)	(70.0–82.0)		
SBP (mm Hg) ^c	150.0	135.0	150.0	130.7	153.8	140.0	0.324	<0.0005
IQR	(142.5–164.2)	(120.2–144.3)	(140.0–160.0)	(123.6–145.0)	(141.8–160.0)	(130.0–150.0)		
DBP (mm Hg) ^c	90.0	80.0	90.0	79.3	91.3	86.5	0.712	<0.0005
IQR	(90.0–98.5)	(80.0–90.0)	(89.3–92.5)	(80.0–90.0)	(89.5–98.6)	(80.0–90.5)		
24-h SBP (mm Hg) ^{c,d}	127.0	123.5	131.0	118.0	131.0	125.5	0.153	<0.0005
IQR	(118.0–142.0)	(115.0–134.3)	(124.0–142.5)	(116.0–130.0)	(119.3–143.0)	(112.0–129.7)		
24-h DBP (mm Hg) ^{c,d}	82.0	80.5	83.0	75.0	79.0	73.0	0.327	<0.0005
IQR	(77.5–89.5)	(71.7–84.7)	(75.5–90.0)	(70.0–82.0)	(70.0–86.3)	(69.0–79.7)		
FMD (%) ^c	7.3	9.3	8.3	9.0	6.7	9.2	0.718	<0.0005
IQR	(4.3–10.3)	(6.3–11.2)	(5.8–10.1)	(7.2–11.7)	(5.0–10.2)	(6.7–12.3)		
EID (%) ^c	11.1	13.4	12.6	12.4	13.0	13.4	0.989	0.089
IQR	(9.0–14.7)	(9.8–17.0)	(10.1–15.9)	(10.2–17.2)	(9.5–15.3)	(9.8–16.8)		

P < 0.05. ACEI: perindopril group; HCTZ: hydrochlorothiazide group; INDA: indapamide group.

ABPM, ambulatory blood pressure monitoring; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; bg, between groups; BMI, body mass index; bpm, beats per minute; DBP, diastolic blood pressure (mean values); EID, endothelial independent dilation; FMD, flow-mediated dilation; HCTZ, hydrochlorothiazide; HR, heart rate; INDA, indapamide; IQR, interquartile range (median values); SBP, systolic blood pressure (mean values); wg, within group.

^aAnalysis of variance. ^b χ^2 -test. ^cGeneral linear model, repeated measures. ^dLog-transformed variables.

Table 2 | Laboratory parameters of the study population at baseline and 12 weeks after antihypertensive treatment

Variables	ACEI (n = 29)		HCTZ (n = 33)		INDA (n = 32)		P (bg)	P (wg)
	Baseline	12 weeks	Baseline	12 weeks	Baseline	12 weeks		
Total cholesterol (mg/dl)	205.0	215.0	198.0	202.0	185.0	184.0	<0.05	0.196
IQR	(185.5–228.0)	(172.5–242.5)	(169.5–209.5)	(175.5–228.5)	(161.0–209.7)	(162.0–211.0)		
HDL-C (mg/dl)	47.0	47.0	44.0	45.5	47.5	46.0	0.879	0.273
IQR	(41.0–56.5)	(40.0–56.5)	(38.0–58.5)	(39.5–59.7)	(39.3–60.0)	(41.0–62.0)		
LDL-C (mg/dl)	126.5	117.0	110.0	125.0	115.0	118.0	0.634	0.367
IQR	(111.0–148.7)	(95.3–146.5)	(84.0–136.5)	(96.0–150.0)	(93.5–134.5)	(91.0–129.5)		
Triglycerides ^a (mg/dl)	110.0	121.0	121	126.0	108.0	111.0	0.395	0.233
IQR	(84.5–189.0)	(78.0–181.5)	(76.0–188.5)	(98.5–169.5)	(73.3–142.5)	(75.0–156.0)		
Apolipoprotein AI (mg/dl)	128.0	131.5	127.0	127.0	120.5	128.5	0.363	0.110
IQR	(110.0–146.0)	(122.3–151.0)	(113.0–142.5)	(111.5–145.0)	(104.0–146.3)	(110.3–148.0)		
Apolipoprotein B100 (mg/dl)	101.0	113.0	92.8	107.0	88.7	96.5	0.184	<0.05
IQR	(89.5–123.5)	(91.1–128.5)	(77.2–111.5)	(94.8–119.0)	(68.9–117.0)	(76.9–111.0)		
Sodium ion ^a (mEq/l)	140.0	140.0	142.0	140.0	141.0	140.0	0.236	0.052
IQR	(138.0–142.0)	(139.0–141.5)	(140.5–143.0)	(138.0–143.0)	(139.3–143.0)	(138.0–141.0)		
Potassium ion (mEq/l)	4.20	4.0	4.10	3.8	4.00	3.9	0.107	<0.005
IQR	(3.85–4.50)	(3.7–4.5)	(3.75–4.40)	(3.5–4.2)	(3.80–4.30)	(3.5–4.1)		
Calcium ion (mEq/l)	1.16	1.18	1.15	1.15	1.17	1.15	0.535	0.220
IQR	(1.11–1.22)	(1.13–1.21)	(1.07–1.18)	(1.11–1.21)	(1.08–1.22)	(1.09–1.20)		
Creatinine (mg/dl)	1.0	0.90	0.9	0.90	0.9	1.00	0.420	<0.05
IQR	(0.8–1.1)	(0.80–1.05)	(0.9–1.1)	(0.80–1.10)	(1.0–1.2)	(0.85–1.10)		
Glucose (mg/dl)	93.0	88.0	87.0	92.0	87.5	89.0	0.293	0.918
IQR	(81.0–104.0)	(83.0–101.0)	(84.0–96.5)	(84.3–104.0)	(76.0–95.0)	(78.0–98.0)		
Glycated hemoglobin (%)	5.4	5.5	5.5	5.5	5.4	5.5	0.980	0.330
IQR	(5.0–5.7)	(5.1–5.9)	(5.1–5.9)	(4.9–6.1)	(5.1–5.7)	(5.3–5.9)		
TBARS ^a (μmol/ml)	1.54	1.33	1.44	1.19	1.58	1.35	0.599	<0.05
IQR	(0.87–2.07)	(0.90–1.83)	(0.91–1.96)	(0.75–1.51)	(0.92–2.18)	(0.87–1.68)		
hsCRP (mg/l)	0.41	0.39	0.46	0.41	0.48	0.38	0.119	0.888
IQR	(0.27–0.56)	(0.27–0.59)	(0.28–0.99)	(0.31–0.86)	(0.27–0.99)	(0.23–0.47)		
Anti-oxLDL Abs ^a (IR)	1.69	1.83	1.75	2.04	1.54	1.77	0.371	<0.005
IQR	(1.21–2.15)	(1.28–3.25)	(1.26–2.45)	(1.53–2.59)	(1.29–1.99)	(1.30–2.30)		

P < 0.05. ACEI: perindopril group; HCTZ: hydrochlorothiazide group; INDA: indapamide group. General linear model, repeated measures. ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; Anti-oxLDL Abs, Anti-oxLDL autoantibodies; bg, between groups; HCTZ, hydrochlorothiazide; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; INDA, indapamide; IQR: interquartile range (median values); TBARS: thiobarbituric acid-reactive substances; wg, within group.
^aLog-transformed variables.

Windows. Numerical data were expressed as median values and interquartile range, or means and s.e.m. are presented. Categorical variables were expressed as number of subjects and percent values. Variables with non-Gaussian distribution were log-transformed for comparisons. In descriptive statistics, analysis of variance-Tukey test was used for independent samples, and Pearson's χ^2 -test was used for categorical variables. A general linear model with repeated measures was used to compare the effects of treatments within and between groups. Pearson's or Spearman's correlation coefficients were tested. A *P* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

Baseline characteristics of the study population

Demographic characteristics, clinical parameters and laboratory results are presented in **Tables 1** and **2**. Subjects in the ACEI, HCTZ, or INDA groups were comparable regarding body weight, body mass index (BMI), waist circumference,

heart rate (HR), office-based, and 24-h ABPM measurements of SBP and DBP.

Endothelium-dependent and independent dilation of the brachial artery at baseline were not different between groups. However, FMD was marginally impaired. Laboratory variables were similar among groups of treatment, except for total cholesterol and sodium ion (**Table 2**). Titers of anti-oxLDL Abs and values for other inflammation markers (high-sensitivity CRP, TBARS) were also comparable in the three groups at baseline.

Effect of BP-lowering treatment

Twelve weeks after the antihypertensive treatments with ACEI, HCTZ, or INDA, there was a decrease in SBP and DBP office (*P* < 0.0005 vs. baseline) and also in BP measurements obtained by 24-h ABPM (*P* < 0.0005), with no differences regarding treatment (**Table 1**). Forty-nine patients (52%) had addition of perindopril (4 mg) at week 6 in order to achieve BP targets.

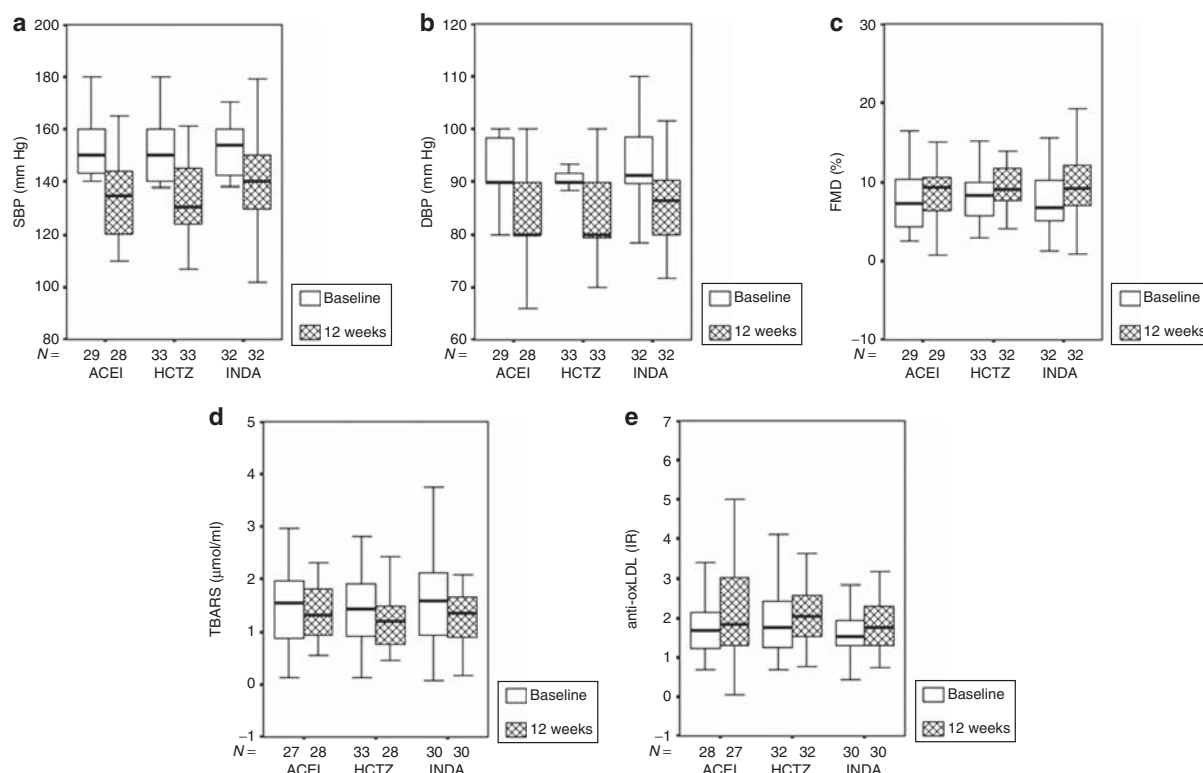


Figure 1 | Box-plots showing medians, interquartiles and 95% confidence interval for (a) systolic blood pressure (SBP), (b) diastolic blood pressure (DBP), (c) flow-mediated dilation (FMD), (d) thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), and (e) anti-oxLDL Abs at baseline and 12 weeks after antihypertensive treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI), hydrochlorothiazide (HCTZ), or indapamide (INDA). ACEI: perindopril (4 mg); HCTZ: hydrochlorothiazide (25 mg); INDA: indapamide (1.5 mg) $P < 0.05$, baseline vs. 12 weeks; general linear model (GLM): repeated measures. ACEI = HCTZ = INDA.

Table 3 | Percent changes in blood pressure, anti-oxLDL Abs, and FMD after treatment compared to baseline

Variable	ACEI	HCTZ	INDA	P
SBP	-12.0 (1.5)	-12.1 (1.2)	-8.0 (1.9)	0.099
DBP	-8.3 (1.7)	-9.1 (1.1)	-5.5 (1.8)	0.229
Anti-oxLDL Abs	15.8 (7.6)	17.2 (6.6)	13.8 (6.5)	0.939
FMD	34.9 (10.6)	32.8 (10.9)	51.9 (24.3)	0.673

Data are means and s.e.m. $P > 0.05$; Analysis of variance. ACEI: perindopril group; HCTZ: hydrochlorothiazide group; INDA: indapamide group.

ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; anti-oxLDL Abs, antioxidantized low-density lipoprotein antibodies; DBP, diastolic blood pressure; FMD, flow-mediated dilation; HCTZ, Hydrochlorothiazide; INDA, Indapamide; SBP, systolic blood pressure.

Box-plots showing medians, interquartiles and 95% confidence interval for SBP and DBP at baseline and 12-week are presented in **Figure 1a,b**.

FMD was improved after BP reduction ($P < 0.0005$ vs. baseline), without differences between treatment arms (**Table 1** and **Figure 1c**). Conversely, the effect of nitrate on vasorelaxation was not affected by BP control (**Table 1**).

Decrease in creatinine and potassium ion levels and increase in apolipoproteins B were observed. The type of treatment did not affect other lipid parameters or glucose levels (**Table 2**).

There was a decrease in lipid peroxidation as measured by the TBARS assay after BP lowering ($P < 0.05$). High-sensitivity

CRP remained unchanged, with values in the normal range since baseline (**Table 2**). **Figure 1d** shows baseline and 12-week distribution of TBARS.

Interestingly, BP control following a 12-week period of anti-hypertensive treatment was accompanied by increase in anti-oxLDL Ab titers ($P < 0.005$ vs. baseline), with no difference between groups regarding therapeutic regimen (**Table 2** and **Figure 1e**).

When assessing percent change in SBP and DBP, anti-oxLDL Ab titers, and FMD from baseline values, it was observed that endothelial function was improved and Ab titers increased as BP and TBARS levels decreased. Similar results were exhibited by all treatment groups (**Table 3**). However, there were no significant correlations between anti-oxLDL Ab titers (or change in this marker after treatment) and the other variables (at baseline, end of study, and percent changes) (data not shown).

DISCUSSION

Our results clearly show that anti-oxLDL Ab titers increased shortly after BP lowering with ACEI, HCTZ, or INDA in a sample population with high BP, who was previously naive of anti-hypertensive treatment and without other known risk factors. Moreover, this study strengthens the possibility that increase in the anti-oxLDL Ab titers is protective against atherosclerosis. A recent study from our group has pointed out to a difference

between the anti-oxLDL Ab titers in two different clinical scenarios: patients with metabolic syndrome after a recent acute coronary syndrome and stable individuals with hypertension.¹⁸ Other studies,^{16,30} suggested that anti-oxLDL Ab titers in unstable patients were lower than in stable ones. These lower levels could be related to increased consumption of Abs due to either an inflammatory response occurring in the circulation or a decreased production as a result of deficient immune capacity.¹⁸ Holvoet *et al.*³¹ showed that high plasma levels of malondialdehyde-modified LDL are present in individuals with stable coronary artery disease and in those with unstable angina. However, he could not differentiate these two subgroups. If we assume that there should be stronger stimuli for LDL oxidation in plaque instability, the decrease in anti-oxLDL Ab titers could be related to formation of immune complexes, their presence in the arterial wall, or even their elimination. Part of the difference resides in the complex nature of the antigen (i.e., oxLDL) that will induce a polyclonal Ab response. Part of these Abs could be protective and another part could aggravate the disease.³² However, the close correlation observed between the *in vivo* levels of circulating or tissue-fixed oxLDL or degree of lesion strongly supports the hypothesis that elevated titers of anti-oxLDL Abs may be protective against atherosclerosis.

The nature of the hypertensive disease seems to be much more complex than a simple elevation in BP measurements, involving a milieu of vascular, cell, humoral, and inflammatory alterations that ultimately lead to the disease itself, promoting activation of the inflammatory cascade, generation of reactive oxygen species, which end up enhancing LDL oxidation,^{5–8} and leading to macrophage uptake of oxLDL.¹⁰ The degraded particle is immunostimulatory,³³ immunogenic, and stimulates production of autoantibodies to LDL and a series of cytokines. These Abs circulate and form complexes with oxLDL and CRP,⁹ and titers of remaining-free Abs can be measured in the plasma. There is a decrease in reactive oxygen species after BP is lowered and therefore fewer stimuli for LDL oxidation. In the present study, these known phenomena can be inferred from both the observed decrease in TBARS and increase in FMD. Thus, it is reasonable to assume that the consumption of anti-oxLDL Abs would decrease, enabling uncomplexed Abs to increase in the plasma. Shoenfeld *et al.* have indeed demonstrated that these circulating complexes are not harmful, and their effects only appear when deposited in tissues.¹⁷

Endothelial function was mildly impaired in our naive hypertensive subjects. Oxidized LDL may contribute to atherosclerosis progression by enhancing endothelial injury and by inducing foam cell generation and smooth muscle proliferation.³⁴ We observed similar reductions in BP with ACEI, HCTZ, or INDA. These changes elicited short-term improvement in endothelial function and decreased plasma peroxidation, as measured by reduction in the TBARS, thus showing that BP control improves other biological parameters related to the risk of atherosclerosis. In previous studies from our group, we have shown attenuation of experimental atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit model³⁵ and in alloxan-induced type 1 diabetes³⁶ by using ACEI, quinapril. Other studies have

shown reduced LDL peroxidation in hypertensive patients as well as in the apolipoproteins E-deficient mice, and a decrease in experimental atherosclerosis³⁷ following inhibition of angiotensin II formation by ACEIs, blocking of the angiotensin II type 1 receptor, and using the latter in combination with statins.³⁸ This confirms the importance of renin-angiotensin system activation on atherogenesis and the possibility of its reversal with renin-angiotensin system blockade.

Because risk factors were excluded, our population was relatively homogeneous and other biases related to LDL modification and immune-response activation were avoided. In addition, because our patients had stage 1 hypertension and were naive of antihypertensive therapy at baseline, we were able to individually evaluate the effect of BP control on anti-oxLDL Ab titers. Recent studies have evaluated the potential therapeutic role of anti-oxLDL autoantibodies either through active or passive immunization,¹⁵ shedding light into immune modulation as novel approaches to treat patients with atherosclerosis and cardiovascular disease.

Limitations and future directions

Our study has limitations for the TBARS assay is relatively insensitive and does not give a conclusive picture of the oxidative state of LDL based on the presence of malondialdehyde adducts. Another issue is the quantification of immune complexes and free Abs. OxLDL does not only constitute one antigen, but a large amount where some react with haptens (e.g., malondialdehyde), some with lipid or lipid-associated antigens, some with proteic antigens either linear or conformational. These questions need to be answered when more defined epitopes are available. However, these circulating immune complexes are not in themselves harmful, causing damage only if they are deposited in tissues.¹⁷

The role of the immunoglobulin M anti-oxLDL Abs has been completely assessed.³⁹ Natural pre-existing immunoglobulin M Abs have been suggested to play a role. These are mainly directed against carbohydrates and glycolipids. However, because the anti-oxLDL response is likely to be a secondary response as Abs always are present reacting against protein epitopes, and that protective Abs can be generated through vaccination,^{17,26} we speculate that the most important subclass is IgG. Therefore, the further delineation of IgG specific Ab epitopes may be future directions of investigation in this fascinating field.

In conclusion, our results are novel and show that human IgG type anti-oxLDL Abs increase shortly after BP control. This effect on the immune response, including anti-oxLDL Ab elevation, seems to be protective since we observed decreased lipid peroxidation and improved endothelial function, known to favorably affect atherosclerosis. These results support the concept that hypertension increases the propensity to LDL oxidation and indicate anti-oxLDL Abs as potential markers in the follow-up assessment of hypertension treatment.

Acknowledgments: We thank Dr Boschcov, former professor at Federal University of Sao Paulo, whose suggestions contributed to improve the quality of the final version of the manuscript. This study was financially supported by research grants from FAPESP (The State of São Paulo Research Foundation), The National Institute of Science and Technology of Complex

Fluids (INCT-FCx), The National Institute of Science and Technology–Nanomaterials for Integrated Markers (INCT-INAMI) and CAPES (National Counsel of Technological and Scientific Development).

Disclosure: The authors declared no conflict of interest.

- Wang Y, Wang QJ. The prevalence of prehypertension and hypertension among US adults according to the new joint national committee guidelines: new challenges of the old problem. *Arch Intern Med* 2004; 164:2126–2134.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289:2560–2572.
- De Ciuceis C, Amiri F, Brassard P, Endemann DH, Touyz RM, Schiffrin EL. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:2106–2113.
- Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 2007; 204:2449–2460.
- Harrison DG, Guzik TJ, Goronzy J, Weyand C. Is hypertension an immunologic disease? *Curr Cardiol Rep* 2008; 10:464–469.
- King DE, Egan BM, Mainous AG 3rd, Geesey ME. Elevation of C-reactive protein in people with prehypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2004; 6:562–568.
- Grundey SM. Oxidized LDL and atherogenesis: relation to risk factors for coronary heart disease. *Clin Cardiol* 1993; 16:13–15.
- Maggi E, Marchesi E, Ravetta V, Falaschi F, Finardi G, Bellomo G. Low-density lipoprotein oxidation in essential hypertension. *J Hypertens* 1993; 11:1103–1111.
- Maggi E, Marchesi E, Ravetta V, Martignoni A, Finardi G, Bellomo G. Presence of autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein in essential hypertension: a biochemical signature of an enhanced *in vivo* low-density lipoprotein oxidation. *J Hypertens* 1995; 13:129–138.
- Keidar S, Kaplan M, Shapira C, Brook JG, Aviram M. Low density lipoprotein isolated from patients with essential hypertension exhibits increased propensity for oxidation and enhanced uptake by macrophages: a possible role for angiotensin II. *Atherosclerosis* 1994; 107:71–84.
- Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997; 349:462–466.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:341–390.
- Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989; 84:1086–1095.
- Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1372–1376.
- Gounopoulos P, Merki E, Hansen LF, Choi SH, Tsimikas S. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Minerva Cardioangiol* 2007; 55:821–837.
- Ketelhuth DF, Tonini GC, Carvalho MD, Ramos RF, Boschcov P, Gidlund M. Autoantibody response to chromatographic fractions from oxidized LDL in unstable angina patients and healthy controls. *Scand J Immunol* 2008; 68:456–462.
- Shoenfeld Y, Wu R, Dearing LD, Matsuura E. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective? *Circulation* 2004; 110:2552–2558.
- Santos AO, Fonseca FA, Fischer SM, Monteiro CM, Brandão SA, Póvoa RM, Bombig MT, Carvalho AC, Monteiro AM, Ramos E, Gidlund M, Figueiredo Neto AM, Izar MC. High circulating autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein are related to stable and lower titers to unstable clinical situation. *Clin Chim Acta* 2009; 406:113–118.
- Wu R, de Faire U, Lemne C, Witztum JL, Frostegård J. Autoantibodies to OxLDL are decreased in individuals with borderline hypertension. *Hypertension* 1999; 33:53–59.
- Frostegård J, Wu R, Lemne C, Thulin T, Witztum JL, de Faire U. Circulating oxidized low-density lipoprotein is increased in hypertension. *Clin Sci* 2003; 105:615–620.
- Su J, Georgiades A, Wu R, Thulin T, de Faire U, Frostegård J. Antibodies of IgM subclass to phosphorylcholine and oxidized LDL are protective factors for atherosclerosis in patients with hypertension. *Atherosclerosis* 2006; 188:160–166.
- Frostegård J, Wu R, Gillis-Haegerstrand C, Lemne C, de Faire U. Antibodies to endothelial cells in borderline hypertension. *Circulation* 1998; 98:1092–1098.
- Wu R, Lemne C, de Faire U, Frostegård J. Antibodies to platelet-activating factor are associated with borderline hypertension, early atherosclerosis and the metabolic syndrome. *J Intern Med* 1999; 246:389–397.
- Cvetkovic JT, Wällberg-Jonsson S, Ahmed E, Rantapää-Dahlqvist S, Lefvert AK. Increased levels of autoantibodies against copper-oxidized low density lipoprotein, malondialdehyde-modified low density lipoprotein and cardiolipin in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41:988–995.
- Fernvik EC, Ketelhuth DF, Russo M, Gidlund M. The autoantibody repertoire against copper- or macrophage-modified LDL differs in normolipidemic and hypercholesterolemic patients. *J Clin Immunol* 2004; 24:170–176.
- Nilsson J, Hansson GK. Autoimmunity in atherosclerosis: a protective response losing control? *J Intern Med* 2008; 263:464–478.
- Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Struijker Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Kjeldsen SE, Erdine S, Narkiewicz K, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Cifkova R, Dominiczak A, Fagard R, Heagerty AM, Laurent S, Lindholm LH, Mancia G, Manolis A, Nilsson PM, Redon J, Schmieder RE, Struijker-Boudier HA, Viigimaa M, Filippatos G, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Kiowski W, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Viigimaa M, Waeber B, Williams B, Zamorano JL. The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension, The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2007; 28:1462–1536.
- Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Meth Enzymol* 1994; 233:425–441.
- Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:257–265.
- Monaco C, Crea F, Niccoli G, Summaria F, Cianflone D, Bordonaro R, Bellomo G, Maseri A. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins in patients with stable angina, unstable angina or peripheral vascular disease: pathophysiological implications. *Eur Heart J* 2001; 22:1572–1577.
- Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Weert F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998; 98:1487–1494.
- Frostegård J, Nilsson J, Haegerstrand A, Hamsten A, Wigzell H, Gidlund M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:904–908.
- Lopez D, Kobayashi K, Merrill JT, Matsuura E, Lopez LR. IgG autoantibodies against beta2-glycoprotein I complexed with a lipid ligand derived from oxidized low-density lipoprotein are associated with arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Clin Dev Immunol* 2003; 10:203–211.
- Holvoet P. Oxidized LDL may contribute to the progression of atherosclerosis by enhancing endothelial injury by inducing foam cell generation and smooth muscle proliferation. *Thromb Haemostasis* 1999; 3:287–293.
- Fonseca FA, Ihara SS, Izar MC, Silva EP, Kasinski N, Lopes IE, Pinto LE, Paiva TB, Tufik S, de Paola AA, Carvalho AC. Hydrochlorothiazide abolishes the anti-atherosclerotic effect of quinapril. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30:779–785.
- Pomaro DR, Ihara SS, Pinto LE, Ueda I, Casarini DE, Ebihara F, Santos AO, Izar MC, Fonseca FA. High glucose levels abolish antiatherosclerotic benefits of ACE inhibition in alloxan-induced diabetes in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45:295–300.
- Keidar S. Angiotensin, LDL peroxidation and atherosclerosis. *Life Sci* 1998; 63:1–11.
- Divchev D, Grothusen C, Luchtefeld M, Thoenes M, Onono F, Koch R, Drexler H, Schieffer B. Impact of a combined treatment of angiotensin II type 1 receptor blockade and 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-reductase inhibition on secretory phospholipase A2-type IIA and low density lipoprotein oxidation in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 2008; 29:1956–1965.
- Binder CJ, Shaw PX, Chang MK, Boullier A, Hartvigsen K, Hörkö S, Miller YI, Woelkers DA, Corr M, Witztum JL. The role of natural antibodies in atherogenesis. *J Lipid Res* 2005; 46:1353–1363.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)