

# **Variedade Interindividual na Resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina**

**Mónica Alexandra Oliveira Rodrigues**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
Mestrado Integrado

Orientador: Prof. Doutor Miguel Castelo-Branco Craveiro de Sousa  
Co-orientadora: Prof. Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro

**março de 2023**

**Folha em branco**

## Declaração de Integridade

Eu, **Mónica Alexandra Oliveira Rodrigues**, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição **41000** do **Mestrado Integrado em Medicina** da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 22/03/2024



**Folha em branco**

## **Agradecimentos**

Ao concluir este trabalho, não podia faltar o agradecimento a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, me apoiaram e incentivaram ao longo da sua realização.

Ao meu orientador, Professor Doutor Miguel Castelo-Branco, agradeço a oportunidade que me proporcionou e a disponibilidade para orientação. Agradeço-lhe a confiança depositada em mim e por me ter desafiado a dar o meu melhor.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Luiza Granadeiro, agradeço a sua dedicação, disponibilidade constante e o apoio incondicional. Agradeço-lhe por ter acreditado em mim e por me ter ajudado a superar os obstáculos que surgiram ao longo do caminho. Foi um apoio fundamental.

À Micaela Almeida, cientista biomédica do CICS, agradeço a sua colaboração no projeto, os seus conhecimentos especializados e a sua disponibilidade para me ajudar sempre que precisei.

Às minhas amigas, agradeço a amizade, o apoio e o incentivo que me proporcionaram durante todo este tempo. Agradeço-lhes essencialmente por me terem ajudado a manter a motivação.

À minha família, agradeço o amor incondicional, o apoio constante e a confiança que sempre depositaram em mim. Agradeço-lhes por me terem proporcionado todas as oportunidades para que eu pudesse alcançar os meus sonhos.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

Muito obrigada!

**Folha em branco**

## **Prefácio**

É com grande entusiasmo que apresento esta tese dedicada ao estudo da farmacogenômica aplicada no tratamento da hipertensão arterial. A pesquisa sobre abordagens terapêuticas eficazes e personalizadas para esta condição médica que apresenta um impacto global tem sido um desafio constante na área da medicina.

Ao longo desta pesquisa, explorou-se a relação entre os genes e a resposta aos fármacos anti-hipertensivos, o que revelou o potencial revolucionário da farmacogenômica na medicina. A compreensão desses mecanismos ambiciona impulsionar avanços significativos no tratamento da hipertensão, beneficiando a vida dos pacientes com hipertensão arterial e oferecendo aos profissionais de saúde uma abordagem mais precisa e direcionada.

**Folha em branco**

## Resumo

A Hipertensão Arterial (HTA) é caracterizada por um aumento consistente e anormal da pressão sanguínea nas artérias. Destaca-se como um fator de risco chave para doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais e outros danos em órgãos vitais. O diagnóstico precoce e tratamento adequado desempenham um papel crucial na prevenção de complicações graves. No acompanhamento do hipertenso, a implementação de alterações no estilo de vida é essencial, no entanto, a terapêutica farmacológica continua a ser o mais importante para o controlo da pressão arterial (PA) e para a prevenção de eventos cardiovasculares adversos. Atualmente a seleção da estratégia de tratamento de pacientes com HTA é empírica e usa como base evidências e consensos de que determinado tratamento ou intervenção é benéfico, útil e eficaz.

A farmacogenómica investiga como é que a genética de um indivíduo influencia a sua resposta ao tratamento da HTA. Este tipo de abordagem tem como principal finalidade a instituição de terapias personalizadas para cada paciente, otimizando os resultados do tratamento e reduzindo possíveis efeitos colaterais de forma a melhorar o controlo global da HTA. Os Bloqueadores dos Canais de Cálcio (BCC) são fármacos amplamente usados no tratamento da HTA. Numerosos estudos indicaram que polimorfismos como os de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms- SNPs*) podem modificar as respostas anti-hipertensivas aos BCC e o risco de eventos cardiovasculares adversos.

O facto de a resposta aos fármacos não ser universal é uma das principais motivações para a aplicação da medicina personalizada. Esta dissertação procura realizar um estudo clínico e pesquisa laboratorial que analise a resposta de pacientes portugueses com HTA a um fármaco BCC, a Amlodipina. Pretende-se também avaliar uma possível correlação entre essa resposta e a variabilidade genética interindividual dos pacientes, facto que poderá sustentar a relevância da farmacogenómica na prática clínica da HTA.

## Palavras-chave

Hipertensão Arterial; Bloqueadores de Canais de Cálcio; Farmacogenómica; Polimorfismos Nucleotídeo único

Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

**Folha em branco**

## **Abstract**

Arterial Hypertension is a medical condition characterized by a consistent and abnormal increase in blood pressure in the arteries. It stands out as a key risk factor for cardiovascular disease, stroke and other damage to vital organs. Early diagnosis and appropriate treatment play a crucial role in preventing serious complications. When monitoring hypertensive patients, implementing lifestyle changes is essential, however, pharmacological therapy continues to be the essential step towards controlling blood pressure and preventing adverse cardiovascular events. Currently, the selection of a treatment strategy for patients with hypertension is largely empirical and is based on evidence and consensus that a given treatment or intervention is beneficial, useful and effective.

Pharmacogenomics investigates how an individual's genetic makeup influences their response to hypertension treatment. This type of approach's main purpose is to provide personalized therapies for each patient, optimizing treatment results and reducing possible side effects to improve overall control of hypertension. Calcium Channel Blockers are widely used in the treatment of hypertension. Numerous studies have indicated that polymorphisms such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) can modify antihypertensive responses to calcium channel blockers and the risk of adverse cardiovascular events.

The fact that the response to medications is not universal is one of the main motivations for the application of personalized medicine. This dissertation seeks to carry out a clinical study and laboratory research that analyzes the response of Portuguese patients with HTN to a CCB drug, Amlodipine. It is also intended to evaluate a possible correlation between this response and the interindividual genetic variability of patients, a fact that could support the relevance of pharmacogenomics in the clinical practice of hypertension.

## **Keywords**

ArterialHypertension;CalciumChannelBlockers;Pharmacogenomics;SingleNucleotidePolymorphism

**Folha em branco**

# Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Definição e Epidemiologia	1
1.1.1.	Prevalência Global da HTA	1
1.1.2.	Prevalência da HTA em Portugal	2
1.2.	Diagnóstico e Patofisiologia da HTA	2
1.2.1.	Causas e tipos de HTA	5
1.3.	Fatores de risco para HTA	6
1.4.	HTA como fator de risco	6
1.5.	Tratamento da HTA	7
1.5.1.	Abordagem não farmacológica	8
1.5.2.	Abordagem farmacológica	8
1.5.3.	Amlodipina	10
1.6.	HTA resistente	11
1.7.	Variedade interindividual genética na resposta à terapêutica da HTA	12
2.	Objetivos	15
3.	Metodologia	16
3.1.	Identificação, avaliação e análise dos genes que influenciam a resposta aos fármacos anti-hipertensivos	16
3.1.1.	Estudos sobre a farmacogenómica da HTA	17
3.2.	Projeto para análise da variabilidade interindividual na resposta a um fármaco anti-hipertensor	22
3.2.1.	Escolha do fármaco específico para ser investigado	22
3.2.2.	Escolha do fármaco específico para ser investigado	22
3.2.3.	Identificação do polimorfismo genético a estudar	23
3.2.4.	Características da população em estudo	23
3.2.5.	Informação relevante para os participantes estudar	24
3.2.6.	Determinação do genótipo da população estudar	24
4.	Resultados e Discussão	26
4.1.	Análise de resultados	26
4.1.	Análise da resposta à amlodipina	31
5.	Conclusões e Perspetivas Futuras	34
6.	Bibliografia	35
	Anexo 1 – Consentimento Informado	40
	Anexo 2 – Protocolo de Extração com o kit Promega	42
	Anexo 3 – Protocolo de Purificação e Envio para a STABVIDA	44

**Folha em branco**

## Lista de Figuras

Figura 1 – SNO no rs1051375, adaptado de (58)	25
Figura 2 – Exão 42 que contém o polimorfismo rs1051375 – G vermelho	26
Figura 3 – Características do polimorfismo rs1051375	26
Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5%	27

**Folha em branco**

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Intervalos alvo do tratamento da HTA no consultório – adaptado de (4)	7
Tabela 2 – Resumo de estudos sobre farmacogenomica dos BCC	18
Tabela 3 – Resumo de estudos sobre farmacogenomica dos IECAs/ARA II	19
Tabela 4 – Resumo de estudos sobre farmacogenomica dos Diuréticos	20
Tabela 5 – Resumo de estudos sobre farmacogenomica dos $\beta$ -bloqueantes	21
Tabela 6 – Representações gráficas da sequenciação de ADN (59)	30
Tabela 7 – Resultados da Sequenciação	31
Tabela 8 – Características dos 8 participantes no estudo	32
Tabela 9 – Participantes que apresentaram PA de difícil controlo	33

**Folha em branco**

## Lista de Acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARA II	Antagonistas dos Recetores de Angiotensina II
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BCC	Bloqueador dos Canais de Cálcio
CICS-UBI	Centro de Investigação em Ciências da Saúde Universidade da Beira Interior
DALY	<i>Disability-Adjusted Life Years</i>
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>
HTA	Hipertensão Arterial
IECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
IMC	Índice de Massa Corporal
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
MAPA	Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	Países Desenvolvidos
PED	Países em Desenvolvimento
PNA	Péptido Natriurético Atrial
PNB	Péptido Natriurético Cerebral
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
ULS	Unidade Local de Saúde

Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

**Folha em branco**

## 1. Introdução

As doenças cardiovasculares e cerebrovasculares são a principal causa de morte e incapacidade a nível mundial. A Hipertensão Arterial (HTA), além de uma doença, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. (1) Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 54% dos acidentes vasculares cerebrais (AVC) e 47% dos casos de doença cardíaca isquémica são consequência direta da hipertensão arterial, que fica assim entre os principais fatores de risco para morbimortalidade cardiovascular. (2)

Atualmente encontra-se então estabelecido que o tratamento da hipertensão arterial pode reduzir o risco de eventos cardiovasculares, incluindo acidente vascular cerebral, doença coronariana e insuficiência cardíaca e renal. (3)

### 1.1. Definição e Epidemiologia

A hipertensão arterial é definida como o nível de pressão arterial a partir do qual os benefícios do tratamento superam os riscos que este possa trazer. Os valores definidos para se considerar a existência de hipertensão são de uma pressão arterial sistólica (PAS) em consultório de pelo menos 140 mmHg e/ou valores de pressão arterial diastólica (PAD) de pelo menos 90 mmHg. Considera-se que o tratamento de pacientes com estes valores de pressão arterial é benéfico, seja através de intervenções no estilo de vida ou recorrendo ao uso de fármacos. (4)

A identificação e o estudo de indicadores de saúde com avaliação da carga da doença fornecem informações importantes e úteis para a priorização de intervenções e quantificação de potenciais ganhos em saúde. (1) Este facto confirma a importância das pesquisas da prevalência da hipertensão arterial, quer seja globalmente, quer seja mais em específico no nosso país e até mesmo em determinadas regiões e grupos populacionais/comunidades.

O facto de vários indivíduos dentro de uma família apresentarem hipertensão arterial implica a existência de uma predisposição genética, que em conjunto com fatores ambientais acaba por determinar a gravidade da elevação da pressão arterial. (2)

#### 1.1.1. Prevalência Global da HTA

Com base na medição de valores de pressão arterial em consultório, estimou-se uma prevalência global de hipertensão de 1,13 mil milhões de pessoas em 2015, e cerca de 150 milhões de casos são correspondentes à população da Europa Central e Oriental. A prevalência global de hipertensão em adultos é de cerca de 30 a 45%, com uma prevalência global padronizada por idade de 24% e 20% em homens e mulheres, respetivamente, no ano de 2015. (4)

A alta prevalência de hipertensão é consistente em todo o mundo, ou seja, está presente tanto nos países desenvolvidos (PD) como nos países em desenvolvimento (PED). A hipertensão

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

torna-se progressivamente mais comum com o avanço da idade, chegando a representar mais de 60% de pacientes afetados com mais de 60 anos. (4)

À medida que as populações envelhecem, habitualmente adotam estilos de vida mais sedentários e aumentam de peso corporal, facto que contribui para o aumento da prevalência da HTA. Estima-se que o número global de pessoas com hipertensão arterial aumentará entre 15% a 20% até 2025 chegando a cerca de 1,5 mil milhões. (4)

### **1.1.2. Prevalência da HTA em Portugal**

Os valores de prevalência de hipertensão arterial em Portugal, foram alvo de estudo pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP) no ano de 2015 através do chamado 1º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015): Estado de Saúde. As estimativas obtidas baseiam-se, para além do autorreporte da doença e da toma de medicação para a mesma, na medição de parâmetros objetivos que definem a doença (no caso da HTA, medições da PA).

Deste estudo, obteve-se como principais resultados, uma prevalência de hipertensão arterial de 36,0% na população residente em Portugal, com idades entre os 25 e os 74 anos. Deste valor, 32,7% correspondente a elementos do sexo feminino e 39,6% a elementos do sexo masculino. No geral verificou-se que a prevalência da hipertensão arterial aumentou com a idade, e o valor mais elevado encontra-se no grupo etário dos 65 aos 74 anos, num total de 71,3% da população afetada. O valor mais baixo em contraste diz respeito ao grupo etário dos 25 aos 34 anos, com um total de 5,7% da prevalência de hipertensão arterial. (1)

Relativamente às diferentes regiões do país, e após padronização para o sexo e grupo etário, o valor mais elevado da prevalência de hipertensão arterial corresponde à região Norte com 37,8%. O valor mais reduzido corresponde à região do Algarve, com uma prevalência padronizada de 32,8%. (1)

Além das diferenças regionais, a prevalência da hipertensão arterial também varia de acordo com o nível de escolaridade e situação profissional. Verificou-se que a prevalência é mais elevada em indivíduos sem escolaridade ou com o ensino básico bem como nos indivíduos sem atividade profissional. Nos indivíduos com ensino superior e indivíduos com atividade profissional remunerada, a prevalência de hipertensão arterial encontra-se mais baixa. (1)

## **1.2. Diagnóstico e Patofisiologia da HTA**

Valores altos da pressão arterial podem ser consequência de um débito cardíaco elevado, resistência vascular periférica também elevada ou mesmo uma combinação de ambos. Estes mecanismos são regulados por processos hemodinâmicos, neurais, humorais e renais e apresentam variações interindividuais. (2)

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

Com o envelhecimento, o aumento da rigidez dos vasos sanguíneos combinado com a existência de resistência vascular periférica elevada, tendem a ser a causa predominante de pressão arterial alta, condicionando o surgimento de hipertensão sistólica isolada. (2)

A regulação da pressão arterial é então um processo complexo e interativo, que envolve vários componentes de um sistema neuro-humoral integrado. Esse sistema abrange a regulação da homeostasia do sódio, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), os péptidos natriuréticos, o endotélio, o sistema nervoso simpático (SNS) e a inflamação e sistema imunitário. Juntos, estes sistemas desempenham um papel crucial na manutenção dos níveis normais da PA, controlando o volume sanguíneo, o débito cardíaco e o tônus arterial. (5)

O sódio desempenha um papel importante na regulação do volume sanguíneo, uma vez que altas concentrações levam à retenção de líquidos, resultando num aumento no volume sanguíneo e, conseqüentemente, de PA. Quando a ingestão dietética de sódio aumenta em indivíduos normotensos, o corpo responde com ajustes hemodinâmicos compensatórios de forma a manter a PA em níveis estáveis. Estas adaptações incluem a redução da resistência vascular periférica e no rim, juntamente com o aumento da produção de óxido nítrico (NO) pelo endotélio vascular, que atua como vasodilatador. (5)

O SRAA está envolvido na regulação da PA e no equilíbrio de fluidos e eletrólitos no corpo. A cascata hormonal começa com a libertação de renina pelas células justa glomerulares nos rins, que promovem a conversão do angiotensinogénio hepático em angiotensina I. A angiotensina I é então transformada na sua forma ativa, a angiotensina II, pela enzima conversora de angiotensina (ECA) nos pulmões. A angiotensina II induz vasoconstrição, elevando a PA e estimulando a libertação de aldosterona pelas suprarrenais. A aldosterona nos rins promove a reabsorção de sódio e água, o que vai levar a um aumento do volume sanguíneo. A angiotensina II também tem influência no coração, causa hipertrofia e fibrose. O SRAA é regulado com a finalidade de manter a homeostasia e desempenha um papel fundamental na gestão da PA, destacando-se como um alvo terapêutico vital no tratamento de doenças cardiovasculares. (5,6)

Os péptidos natriuréticos, como o péptido natriurético atrial (PNA) e o péptido natriurético cerebral (PNB), desempenham um papel crucial na sensibilidade ao sódio e na regulação da PA. Esses péptidos desempenham um papel essencial na regulação do sódio e da PA, principalmente quando a quantidade de sódio aumenta, em que promovem a excreção de sódio e a vasodilatação. Após a ingestão de sódio, o estiramento das aurículas e dos ventrículos cardíacos, desencadeiam a libertação de PNA e PNB. Dessa dilatação, resulta uma vasodilatação sistémica e uma redução do volume plasmático, pela redistribuição de líquidos do compartimento intravascular para o interstício, contribuindo para a redução da PA. Os péptidos natriuréticos também afetam a taxa de filtração glomerular quando há expansão do volume sanguíneo. Além disso, inibem a reabsorção de sódio nos rins. (5)

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

As células endoteliais são responsáveis pela produção de diversas substâncias vasoativas, como o NO. O NO relaxa os músculos lisos dos vasos sanguíneos, o que leva a uma redução na PA. Quando a produção de NO é prejudicada, a pressão arterial pode aumentar, levando à HTA. Além do NO, o endotélio secreta outras substâncias que afetam o tônus vascular, como vasodilatadores e vasoconstritores. (5)

O SNS também desempenha um papel fundamental na regulação da função cardiovascular, tornando-se um elemento-chave no desenvolvimento da HTA e de outras doenças cardiovasculares. Este sistema é ativado por uma série de estímulos que resultam numa maior libertação de norepinefrina a partir tanto dos terminais nervosos simpáticos como da medula suprarrenal. A norepinefrina liga-se aos recetores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos presentes nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos causando vasoconstrição e um aumento do débito cardíaco. Esta atividade aumentada do SNS em indivíduos com HTA contribui para a persistência da PA elevada. A abordagem do SNS emerge como uma estratégia terapêutica fundamental não apenas no tratamento da hipertensão, mas também para uma ampla variedade de doenças cardiovasculares. (5)

A hipertensão não resulta apenas de alterações na dinâmica circulatória, a inflamação e o sistema imunológico também influenciam na patogénese da HTA. Os mecanismos imunológicos tanto os inatos como os adaptativos são fundamentais para o desenvolvimento da hipertensão, contribuindo para o *stress* oxidativo e mudanças inflamatórias em órgãos vitais como os rins, vasos sanguíneos e o cérebro. No global, a hipertensão surge de uma rede de interações complexas envolvendo também a inflamação, o sistema imunitário e respostas fisiológicas. (5)

Compreender estes mecanismos associados com a existência de HTA é fundamental para desenvolver estratégias eficazes no controlo e tratamento da hipertensão e de complicações associadas.

A pressão arterial é organizada de acordo com vários graus. Recomenda-se que seja classificada como ótima, normal, normal-alta ou hipertensão grau 1, grau 2 e grau 3, de acordo com a pressão arterial medida em consultório. Considera-se que a pressão arterial é ótima quando a pressão sistólica é inferior a 120 mmHg e a pressão diastólica é inferior a 80 mmHg. A pressão arterial normal atinge os valores sistólicos de 120 a 129 mmHg e/ou diastólicos de 80 a 84 mmHg, enquanto já se considera pressão arterial normal alta a existência de valores de 130 a 139 mmHg e/ou diastólicos de 85 a 89 mmHg. (4)

De acordo com as *guidelines* da Sociedade Europeia de Cardiologia, o grau 1 é caracterizado pela existência de uma PAS de 140 a 159 mmHg e/ou uma PAD entre 90 e 99 mmHg. No grau 2, a PAS encontra-se nos valores entre 160 e 179 mmHg, e/ou a PAD atinge 100 a 109 mmHg. O grau 3, é identificado por níveis de PAS de 180 mmHg ou superior e/ou PAD igual ou superior a 110 mmHg. Por fim, a hipertensão sistólica isolada ocorre quando apenas a pressão arterial sistólica está elevada, acima de 140 mmHg, enquanto a pressão diastólica permanece abaixo de

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

90 mmHg. De notar que esta classificação é usada em jovens, pessoas de meia-idade e idosos. Nas crianças e adolescentes são usados percentis de pressão arterial. (4) Essa classificação é fundamental para orientar a terapêutica de cada paciente, visando o controlo eficaz da HTA e a prevenção de complicações associadas.

A medição da pressão arterial não deve ser feita de forma aleatória. No consultório médico, devem ser realizadas 3 medições contando mais de 5 minutos após o paciente se sentar e cada uma das medições deve ser intervalada em 1 a 2 minutos. Numa primeira avaliação, a pressão arterial deve ser medida nos 2 braços e nas medições subsequentes devem ser sempre realizadas no braço que apresentou valores mais elevados. De salientar que se inicialmente for notada uma diferença entre os dois braços superior a 20 mmHg na pressão arterial sistólica ou 10 mmHg na pressão arterial diastólica, devemos descartar determinadas potenciais causas desta diferença. (2)

O diagnóstico de HTA deve ser confirmado através do exame de monitorização ambulatória da pressão arterial 24 horas (MAPA) ou através de medições automatizadas da pressão arterial realizadas em casa. Nestes casos, os valores de diagnóstico são ajustados inferiormente já que no geral os valores de pressão arterial são mais baixos nestas condições. O MAPA é útil para determinar se estamos perante um caso de síndrome da bata branca ou de hipertensão mascarada. (2)

### **1.2.1. Causas e tipos de HTA**

Existem essencialmente dois tipos de hipertensão arterial. Hipertensão arterial primária ou essencial, em que não é conhecida a causa, e que representa a situação mais frequente (aproximadamente 90 a 95% dos casos). Apesar de não ser possível detetar uma causa específica para este tipo de hipertensão, sabem-se os fatores que podem contribuir para o aumento da pressão arterial, como por exemplo, o consumo excessivo de sal, a obesidade, o envelhecimento e o stress emocional. O segundo tipo mais frequente de hipertensão arterial é a hipertensão arterial secundária, e encontra-se em pacientes com uma causa identificável e causadora desse aumento de pressão arterial, que poderá inclusivamente ser tratada com uma intervenção específica e dirigida. (7) As causas de hipertensão secundária, como por exemplo a estenose da artéria renal, o hiperaldosteronismo ou feocromocitoma, devem ser consideradas no diagnóstico diferencial, principalmente quando encontrados pacientes com pressão arterial difícil de controlar ou em pacientes mais jovens. (2) A hipertensão secundária a uma causa potencialmente tratável representa cerca de 10% de casos de pacientes com pressão arterial elevada. (7)

Antes de iniciar qualquer tratamento para a hipertensão arterial, deve-se avaliar as potenciais causas de hipertensão arterial por forma a excluir causas secundárias já que a hipertensão arterial secundária exige uma abordagem diagnóstica e terapêutica específica. (7)

### **1.3. Fatores de risco para HTA**

Globalmente, a idade e o Índice de Massa Corporal (IMC) são preditores independentes para o aumento da PA. (8) A prevalência da HTA na população com idade mais avançada encontra-se interligada com uma série de transformações fisiológicas, como a aterosclerose e as próprias alterações vasculares relacionadas com a idade. Neste sentido, constata-se que a idade avançada está intimamente relacionada com uma maior ocorrência de HTA. (9) Os fatores ambientais e comportamentais, em particular o consumo de sal, exercem uma influência substancial na expressão do fenótipo da HTA primária. (10)

Os fatores de risco para o desenvolvimento de HTA estão a aumentar tanto nos PD como nos PED e estes englobam comportamentos como o tabagismo, o consumo de álcool e os hábitos sedentários. (8) A obesidade ( $IMC \geq 25$ ) e o consumo frequente de sal e carnes vermelhas, consumo reduzido de frutas e o abuso do álcool estão associados a um maior risco de desenvolver HTA. Os não consumidores de álcool chegam a apresentar uma probabilidade 70% inferior de desenvolver HTA quando comparado a consumidores frequentes. (9) Adicionalmente, em contextos mais rurais, nos PED, existem estudos que têm demonstrado que os sistemas de saúde mais fracos são a principal, embora não única, causa do aumento da incidência de hipertensão na população mais jovem. (8)

Os antecedentes familiares de hipertensão também estão associados a um maior risco de desenvolver HTA. (9) É amplamente reconhecido que a HTA tem uma base hereditária significativa, com estimativas a variar entre os 25% e 60% de hereditariedade geral na população. Evidências provenientes de estudos pré-clínicos e clínicos têm consistentemente demonstrado que a PA elevada e os riscos cardiovasculares associados resultam não só dos fatores ambientais e comportamentais mencionados anteriormente, mas também de uma complexa interação entre fatores genéticos e influências ambientais. (10)

### **1.4. HTA como fator de risco**

A PA elevada foi considerada como o principal contribuinte global para a morte prematura em 2015, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes e mais de 200 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade. (4) Apesar do avanço tecnológico e avanço no tratamento, verificou-se em pesquisas internacionais que a prevalência de pressão arterial sistólica elevada aumentou, condicionando um aumento de cerca de 40% nos anos de vida saudável perdidos por incapacidade (*Disability-adjusted life years - DALY*) nos últimos 30 anos. (11)

A PAS de pelo menos 140 mmHg é responsável pela maior parte da carga de mortalidade e incapacidade (70%). A maioria das mortes relacionadas com a hipertensão arterial deve-se a doença cardíaca isquémica, AVC hemorrágico e AVC isquémico. (4)

A hipertensão traz também risco acrescido de desenvolvimento de fibrilhação auricular, risco aumentado de surgimento de demência e de surgimento de declínios cognitivos. (4)

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

A hipertensão arterial raramente ocorre isolada e é frequentemente associada a outros fatores de risco cardiovascular, como dislipidemia e intolerância à glicose. Esse agrupamento de fatores de risco metabólico tem um efeito multiplicador no risco cardiovascular. Desta forma, a quantificação do risco cardiovascular total é uma parte importante do processo de estratificação de risco para pacientes com hipertensão arterial. (4)

### 1.5. Tratamento da HTA

Com o passar dos anos e potenciado pela análise de dados epidemiológicos, tem-se verificado uma progressão global nas estratégias de tratamento, modalidades de diagnóstico, e na própria definição de hipertensão arterial. Devido a tais avanços, os objetivos do tratamento foram ajustados de forma a obter o melhor benefício do paciente. (12)

Na maioria dos pacientes com hipertensão arterial essencial, a pressão arterial pode ser controlada e o risco cardiovascular reduzido através de uma combinação de intervenções no estilo de vida e fármacos anti-hipertensivos de primeira linha. (2) Diversos estudos demonstraram que iniciativas estruturadas e orientadas para o tratamento da pressão arterial com acompanhamento regular por parte de profissionais de saúde e com o fornecimento de medicação compartilhada resultam numa melhoria substancial no controle da PA. (13)

De acordo com as diretrizes europeias atuais, a pressão arterial alvo para todos os pacientes refere-se a valores de PAS inferiores a 140 mmHg e valores de PAD menores que 90 mmHg, independentemente da existência de outras patologias, como por exemplo a diabetes e a doença renal crônica. (2) Se o tratamento for bem tolerado pelo paciente, pode e deve ser definido um limite inferior. Se o paciente tiver idade compreendida entre os 18 e os 65 anos, e apresentar apenas hipertensão arterial ou hipertensão arterial e diabetes, o alvo de PAS a atingir é de 130 mmHg ou menos se tolerado, sem nunca baixar dos 120 mmHg. (4) Os valores alvo em específico podem ser encontrados na tabela 1:

Intervalos alvo do tratamento da PAS no consultório (mmHg)						Intervalo alvo de PAD no consultório (mmHg)
Idade	HTA	+ Diabetes	+ DRC	+ DAC	+AVC/AIT	
<b>18-65 anos</b>	130 ou menos se tolerado Não < 120		<140 a 130 se tolerado	130 ou menos se tolerado Não < 120		70-79
<b>65-79 anos</b>	130 a 139 se tolerado					
<b>≥ 80 anos</b>	130 a 139 se tolerado					
Intervalo alvo de PAD no consultório	70-79					

Tabela 1 – Intervalos alvo do tratamento da HTA no consultório – adaptado de (4)

DRC – Doença Renal Crônica; DAC – Doença Arterial Coronária; AVC/AIT – Acidente Vascular Cerebral/Acidente Isquêmico Transitório

### **1.5.1. Abordagem não farmacológica**

A terapia não farmacológica é especialmente útil na prevenção da hipertensão, tanto em adultos com pressão arterial elevada como no tratamento da pressão arterial elevada em adultos com formas mais leves de hipertensão. A prevenção da hipertensão e o tratamento da hipertensão já estabelecida são abordagens complementares usadas de forma a reduzir o risco das doenças cardiovasculares na população, no entanto, salienta-se que a prevenção da hipertensão fornece o meio ideal de reduzir este risco e de evitar as consequências nocivas da hipertensão arterial. (13)

Corrigir hábitos alimentares, combater a inatividade física e eliminar o consumo excessivo de álcool, são abordagens fundamentais para a prevenção e tratamento da pressão arterial elevada, tendo em conta que estes fatores promovem o aumento da pressão arterial. (13) A principal medida alimentar usada no controlo da pressão arterial é a redução do sal na dieta, que preferencialmente deve ser acompanhada de uma alimentação equilibrada. (2) No caso dos fumadores, é importante deixar de fumar, os pacientes obesos devem perder peso e todos sem exceção devem praticar exercício físico. (2)

As abordagens não farmacológicas podem ser usadas isoladamente ou em combinação com terapia farmacológica. (13)

### **1.5.2. Abordagem farmacológica**

Segundo as *guidelines* da Sociedade Europeia de Cardiologia para o tratamento da hipertensão arterial, consideram-se como fármacos de primeira linha os bloqueadores dos canais de cálcio (BCC), os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECAs), os antagonistas dos recetores de angiotensina II (ARA II) e os fármacos diuréticos.(2,4) Os  $\beta$ -bloqueantes e os bloqueadores dos recetores de mineralocorticoides (inibidores de aldosterona) são eficazes e, portanto, usados em pacientes cuja pressão arterial não consegue ser mantida numa faixa aceitável com os fármacos de primeira linha. (2) Os tratamentos com IECAs, ARA II e antagonistas dos receptores mineralocorticoides são usados para modular o SRAA. (6) Estes fármacos apresentam flexibilidade de administração, permitindo diversas abordagens no tratamento. Podem ser usados como terapia única, em combinação de dose fixa de dois fármacos ou como parte de um comprimido combinado com três fármacos. O objetivo é aumentar a adesão do paciente ao regime de tratamento. (14)

Os BCC controlam a PA principalmente através da redução do influxo de cálcio no leito vascular periférico. São medicamentos que se ligam e bloqueiam principalmente os canais de cálcio tipo L presentes nas células cardíacas e vasculares do musculo liso. (15,16) Os BCC, ao impedir que os íões de cálcio entrem na musculatura lisa vascular, reduzem a pressão arterial pelo facto de causarem relaxamento muscular e vasodilatação e consequentemente levarem a uma diminuição da resistência vascular. (17) Cada subclasse de BCC liga-se a um local específico. Por exemplo, as dihidropiridinas exercem seletividade vascular, o verapamil tem seletividade cardíaca e o diltiazem pode atuar tanto no coração quanto nos vasos sanguíneos. (18)

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

Os IECAs desempenham um papel fundamental na redução da PA. Eles atuam bloqueando a conversão da angiotensina I em angiotensina II, o que resulta em vasodilatação, diminuição da resistência vascular e, conseqüentemente, redução da pressão arterial. Além disso, oferecem benefícios adicionais, como a proteção de órgãos-alvo. Esses benefícios podem ser traduzidos na redução da hipertrofia do ventrículo esquerdo cardíaco, na melhora da função endotelial e na remodelação arterial. Uma característica notável dos IECAs é a capacidade de influenciar a rigidez das artérias, o que é muito benéfico para a saúde cardiovascular. (18)

Os ARA II atuam antagonizando os efeitos da angiotensina II, especificamente no recetor AT<sub>1</sub>, com alta afinidade e uma ligação eficaz que se mantém ao longo do tempo, proporcionando efeitos de longa duração na redução da pressão arterial. Além de ter eficácia na redução da PA, os ARA II também ajudam a proteger órgãos-alvo dos pacientes com HTA, incluindo o coração e os rins. Desta forma, também se considera que os ARA II se destacam como uma opção muito valiosa e bastante abrangente para o tratamento da HTA. (6,18,19)

Os diuréticos tiazídicos e os diuréticos de ansa aumentam a natriurese e a diurese. Ambos podem ser considerados uma importante classe terapêutica de medicamentos anti-hipertensivos. Os diuréticos são frequentemente recomendados como tratamento de primeira linha para a HTA devido aos benefícios comprovados na redução da PA e na diminuição da morbidade e mortalidade global associada. Estes fármacos apresentam resultados comparáveis aos de outras classes de medicamentos, como por exemplo os IECAs e os BCC. Além disso, acabam por se destacar em grupos específicos de pacientes, apresentando vantagens por exemplo nos diabéticos, nos idosos, em pacientes com insuficiência cardíaca, hipertensão sistólica isolada ou hipertensão arterial resistente. (18,20)

Apesar de não representarem farmacoterapia anti-hipertensiva de primeira linha, os  $\beta$ -bloqueantes são fármacos amplamente usados na prática clínica. (16) Estes atuam como antagonistas dos recetores adrenérgicos e distinguem-se pela seletividade para os recetores  $\beta$ -1 e  $\beta$ -2, pelas suas propriedades intrínsecas, pela solubilidade lipídica e também pela capacidade de induzir vasodilatação. Existem três gerações de  $\beta$ -bloqueantes. A primeira não é seletiva para subtipos, a segunda é seletiva para  $\beta$ -1 e a terceira inclui  $\beta$ -1 seletivos e não seletivos, com propriedades adicionais, como antagonismo no recetor  $\alpha$ -1 ou indução de óxido nítrico. Essas características permitem apresentar variedade e seletividade para o uso clínico. (21)

Os antagonistas mineralocorticoides podem ser utilizados no tratamento da HTA atuando através de uma inibição dos efeitos da aldosterona nos rins. Essa ação resulta na redução da retenção de sódio e água, o que, por sua vez, leva à diminuição do volume sanguíneo e, conseqüentemente, à redução da PA. Esses fármacos podem ser incluídos em terapias combinadas com outros anti-hipertensivos, e são especialmente úteis em situações de HTA resistente. Um exemplo desses fármacos, que é inclusive dos mais prescritos, é a Espironolactona. (18,22–24)

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

O controlo e manutenção da pressão arterial recorrendo aos fármacos anti-hipertensivos demonstrou ser eficaz na prevenção de eventos cardiovasculares em todas as formas de hipertensão arterial, tal como a hipertensão arterial diastólica isolada, a hipertensão arterial sistólica-diastólica combinada e a hipertensão sistólica isolada que é a mais comum entre os pacientes idosos. (25)

Considerando os fármacos disponíveis e úteis no tratamento da hipertensão arterial a terapêutica inicial deve ser composta por uma combinação dupla, que pode ser uma associação de IECA ou ARA II com um diurético ou com um BCC. Deve iniciar-se sempre o tratamento com dois fármacos simultaneamente em que um deles tem de ser um modelador do SRAA. De notar que a seleção da combinação é realizada pelo clínico de forma amplamente empírica. O segundo passo do tratamento do paciente hipertenso, passa por uma combinação tripla, com a conjugação de um IECA ou um ARA com um BCC e com um diurético. Este passo é utilizado caso a terapia inicial em combinação dupla não seja suficiente para alcançar os valores de pressão arterial alvos. (4)

A taxa global do controlo da pressão arterial em pacientes hipertensos, apesar da combinação de fármacos disponível, continua baixa. Este facto remete para uma necessidade urgente de fazer face aos fatores que contribuem para tal. Pode dever-se a casos de inércia no tratamento, em que o clínico não aplica a escala terapêutica, ou a uma má adesão do doente à medicação. (4) Seria de extrema importância encontrar também a combinação mais adequada a cada paciente individualmente, já que a eficácia das diferentes combinações pode eventualmente ser influenciada por fatores genéticos.

### **1.5.3. Amlodipina**

A amlodipina é um BCC da subclasse das dihidropiridinas que inibe o influxo transmembranar de cálcio nos canais de tipo L das células musculares cardíacas e nas células do músculo liso vascular. O efeito anti-hipertensivo da amlodipina é uma consequência da vasodilatação periférica e subsequente redução da resistência vascular sistémica. O fármaco tem uma semivida de cerca de 30 a 45 horas, o que permite que seja administrado diariamente e que mantenha o efeito anti-hipertensivo mais de 24 horas após uma única dose. (26,27)

A dose inicial habitual é de 5mg de amlodipina diária, mas pode ser aumentada até ao máximo de 10mg consoante necessidade do paciente. (28) Nos doentes com HTA este fármaco tem sido utilizado em combinação com outros fármacos anti-hipertensivos, como foi indicado anteriormente.

Nos pacientes que apresentem insuficiência hepática grave, o fármaco deve ser titulado lentamente, começando sempre na dose mais baixa. Quanto aos pacientes com compromisso renal, como as alterações na concentração plasmática da amlodipina não estão relacionadas com o grau de compromisso renal, esta pode ser usada em doses normais. Nos doentes que apresentem insuficiência cardíaca o tratamento deve ser realizado com especial atenção já que

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

podem aumentar o risco de eventos cardiovasculares e mesmo aumentar o risco de mortalidade. (28)

Como principais contraindicações à toma de amlodipina, temos a existência de hipersensibilidade aos derivados das dihidropiridinas e amlodipina, casos de hipotensão grave (porque é um BCC), casos de choque incluindo o cardiogénico, casos em que haja obstrução do infundíbulo do ventrículo esquerdo como a obstrução causada por um grau de estenose aórtica elevada e também em casos de insuficiência cardíaca hemodinamicamente instável após um enfarte agudo de miocárdio. (28)

Após a ingestão de doses terapêuticas, a amlodipina é bem absorvida e atinge os picos séricos entre as 6 e as 12 horas após a toma. A biodisponibilidade absoluta varia entre os 64% e os 80% e não é afetada pela alimentação. O tempo necessário para atingir o pico sérico é idêntico nos idosos e nos indivíduos mais jovens com a diferença de que, nos doentes idosos, a depuração da amlodipina tende a ser mais reduzida, facto pelo qual os aumentos de dose devem ser efetuados com precaução. Quanto ao volume de distribuição este é de aproximadamente 21 L/kg. Aproximadamente 97,5% da amlodipina presente na corrente sanguínea está ligada a proteínas plasmáticas. (28)

A amlodipina é extensivamente metabolizada pelo fígado em metabolitos inativos sendo de 10% a eliminação urinária da amlodipina e de 60% a eliminação dos metabolitos. (28)

As reações adversas reportadas com maior frequência durante a toma de amlodipina foram sonolência, tonturas, cefaleias, palpitações, rubor, dor abdominal, náusea, inchaço dos tornozelos, edema e fadiga. (28)

### **1.6. HTA resistente**

A HTA resistente é uma condição médica caracterizada pela incapacidade de controlar adequadamente a pressão arterial, mesmo com o uso de três ou mais classes diferentes de fármacos anti-hipertensivos, tomados de forma regular. (2,22)

A existência de uma incapacidade de controlar a PA é bastante desafiante e apresenta risco significativo para complicações cardiovasculares. Esta resistência pode ser causada por uma variedade de fatores, incluindo genéticos, comportamentais e médicos. Os fatores genéticos desempenham um papel crucial na predisposição à HTA resistente, afetando a resposta do corpo aos medicamentos anti-hipertensivos. O estilo de vida, incluindo a dieta inadequada, o sedentarismo, o consumo de álcool e o tabagismo, também podem contribuir para a existência de HTA resistente. É fundamental realizar investigação contínua, de forma a aprofundar o conhecimento dos mecanismos subjacentes à HTA resistente e, dessa forma, desenvolver estratégias terapêuticas inovadoras e mais eficazes. (23,24,29)

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

O tratamento da HTA resistente geralmente exige uma abordagem terapêutica multifacetada e inclui a administração de medicamentos anti-hipertensivos de diferentes classes. Conforme foi abordado anteriormente, é crucial considerar alterações do estilo de vida como parte integrante do tratamento. (24) Já no contexto da abordagem farmacológica da HTA resistente, quando os pacientes não respondem à terapêutica tripla mencionada anteriormente, uma opção a equacionar é a inclusão de espirolactona, que é um fármaco inibidor de aldosterona. De salientar que sensivelmente 5% dos pacientes hipertensos têm de recorrer a esta combinação por apresentarem hipertensão resistente. (4) Uma abordagem holística é crucial para obter sucesso no controlo da PA. (29)

A HTA resistente é um bom exemplo de uma situação em que a escolha inadequada de medicamentos pode contribuir para problemas contínuos, riscos de saúde e até desmotivação do próprio paciente. Estes pacientes têm um risco aumentado de resultados adversos em comparação com pacientes com hipertensão não resistente. A decisão de baixar a pressão arterial em pacientes com HTA resistente pode traduzir uma oportunidade de personalizar o tratamento. (19)

### **1.7. Variedade interindividual genética na resposta à terapêutica da HTA**

Segundo vários estudos, sabe-se que existe uma forte componente genética para a HTA, com estimativas de hereditariedade que vão desde os 25% até aos 60% na população em geral, conforme foi mencionado anteriormente. Dados pré-clínicos e clínicos sugerem que o aumento da PA e os riscos cardiovasculares associados são, em grande parte, secundários à interação entre características genéticas e o meio ambiente. Os fatores genéticos não afetam apenas a elevação da PA, mas também contribuem para a variabilidade interindividual na resposta ao tratamento anti-hipertensivo. (10,16)

Os Estudos de Associação de Genoma Completo (*Genome-wide association studies - GWAS*) e as técnicas de sequenciamento genético, revelaram várias vias relacionadas com a PA. Estes estudos, baseiam-se essencialmente no facto de a determinado genótipo estar associada uma característica (fenótipo). Ambas as técnicas podem ser utilizadas em estudos genéticos de larga escala, e não requerem que existam relações de parentesco. (10)

Os polimorfismos genéticos têm o potencial de afetar as respostas a fármacos através de vários fatores genéticos. Esses fatores englobam genes relacionados ao desenvolvimento da HTA capazes de alterar os efeitos dos medicamentos, modificações nas interações mecânicas entre fármacos e genes, variações nas enzimas de metabolização de fármacos, genes associados a transportadores de fármacos e genes que estão envolvidos em cascatas complexas e reações metabólicas. (16)

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

A farmacogenômica dos fármacos anti-hipertensivos requer esforços que possibilitem desvendar genes e variantes adicionais e determinar as vias epigenéticas e regulatórias envolvidas na resposta aos medicamentos anti-hipertensivos. (30)

Uma estratégia farmacogenômica baseada na escolha de um plano de tratamento altamente eficaz e bem tolerado pode ser de enorme utilidade. Esta envolve o uso de menos fármacos por paciente, resultando numa melhor relação entre custo e eficácia, e num controlo mais eficaz da PA. Por sua vez, este resultado pode ajudar a prevenir incidentes cardiovasculares e renais, melhorando a qualidade de vida e a longevidade dos pacientes com HTA. (16)

Os GWAS também melhoraram a compreensão da genética da HTA e forneceram evidências que sugerem que grande parte da influência genética na hipertensão reside em elementos não codificantes e opera através de interações gene-gene. (30)

Uma abordagem que utilize terapia geneticamente direcionada para tratar a HTA, pode reduzir os custos totais inerentes ao tratamento ao longo de três anos em até 47%. Surpreendentemente, 89% dessa redução está relacionada com a prevenção de eventos adversos específicos. (16) Os resultados de estudos e prática clínica validam a eficácia da terapêutica anti-hipertensivas baseadas no genoma, já que esta contribui para evitar eventos adversos significativos e, ao mesmo tempo, reduz os custos do tratamento.

Os SNPs representam pares de bases específicos em posições fixas do genoma que exibem variação interindividual. Os GWAS envolvem a genotipagem de milhares de SNPs do genoma humano. Esta variabilidade pode estar associada a uma maior suscetibilidade a doenças específicas. Ao comparar os SNPs de indivíduos com HTA em relação aos de indivíduos não hipertensos, torna-se possível identificar quais dessas variantes genéticas estão interligadas ao fenótipo em estudo. (31) A importância dos estudos reside no objetivo de descobrir SNPs relevantes para a HTA através da realização de GWAS.

Uma abordagem genética mais clássica envolve a investigação de genes candidatos. Nesse tipo de estudo, a análise de variantes genéticas de interesse, relacionadas à função biológica e ao potencial impacto numa doença específica, é predominantemente conduzida recorrendo à técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). O processo inicia-se com a função conhecida do gene em questão, e a partir desse conhecimento, presume-se uma possível relação com a doença em análise. A partir desta possível relação devem ser realizados estudos que possam testar a validade das hipóteses. (32)

Embora se tenha vindo a mostrar vantajosa, a eficácia da terapia anti-hipertensiva é afetada por fatores como a raça, sexo, idade e variações interindividuais. Este facto pode explicar pacientes com hipertensão que apresentam valores de pressão arterial fora dos parâmetros ideais e descontrolados mesmo tendo uma adesão rigorosa ao tratamento proposto. (14) A natureza poligénica da hipertensão torna então difícil a procura pelos SNPs associados mais apropriados,

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

bem como as relações entre genes individuais e as respostas a fármacos em diferentes grupos étnicos. (16) Este facto revela a importância do estudo de genes que afetem o metabolismo e o transporte de fármacos que possam contribuir para a etiologia das diferenças interindividuais na resposta ao tratamento da pressão arterial. As variações do genoma humano, potenciadas pelos SNPs, estão na génese da variabilidade da resposta individual a determinado fármaco numa população. (14) A suscetibilidade a reações adversas a fármacos também pode apresentar variações interindividuais.

Através da implementação de GWAS têm sido descobertos vários SNPs relevantes para a HTA dos quais se enunciam por exemplo os seguintes (16):

- Polimorfismo CYP3A4\*1B (-392A/G, rs2740574) do gene CYP3A4 → Mulheres portadoras do alelo A tratadas com Amlodipina (BCC) parecem atingir pressão arterial média (PAM) alvo de 107 mmHg mais facilmente que homens com genótipos idênticos;
- Polimorfismo rs2357928 do gene CACNB2 → Portadores do genótipo GG aparentam ter um risco aumentado de desfechos primários ao ser tratados com Verapamil (BCC) em comparação com os pacientes que tomavam Atenolol ( $\beta$ -bloqueante);
- Polimorfismo -58C/T rs1799722 do gene BDKRB2 → O genótipo TT parece surgir mais frequentemente em indivíduos que respondem melhor ao Enalapril (IECA) quando comparado a indivíduos que respondem mal;
- Polimorfismo I/D rs1799752 do gene ACE → Portadores do genótipo I/I podem ter melhores respostas anti-hipertensivas à Hidroclorotiazida (diurético) em comparação com os portadores do genótipo D/D. (16)

## 2. Objetivos

A hereditariedade genética relacionada com a resposta a fármacos permanece enigmática, com características complexas, e influenciada por múltiplos genes e fatores. Assim, é imperativo realizar estudos adicionais de forma a explorar todas as opções e desenvolver recomendações definitivas para tratamentos que tenham como base características genéticas. (16)

O principal objetivo deste estudo é o de desenvolver um projeto que permita avaliar a variabilidade genética interindividual na resposta ao fármaco BCC, a Amlodipina. Através deste estudo exploratório, deverá ser possível identificar os polimorfismos genéticos associados a esta variação em pacientes portugueses previamente diagnosticados com hipertensão arterial.

De forma a alcançar o objetivo principal, foram estabelecidos objetivos secundários a serem realizados por etapas.

Inicialmente foi realizada uma extensa pesquisa bibliográfica que culmina numa revisão sistemática sobre o tema. Posteriormente, numa fase inicial, é necessário realizar:

- Identificação geral dos genes que influenciam a resposta aos fármacos anti-hipertensivos;
- Avaliar o impacto dos genes identificados nos fenótipos de resposta farmacológica;
- Analisar os genes e o seu impacto no tratamento farmacológico da HTA;

Depois de analisados os genes e o seu impacto no tratamento farmacológico da HTA, para chegar ao objetivo principal, foram perseguidos os seguintes objetivos secundários:

- Escolher um fármaco específico para ser investigado;
- Determinação do gene candidato a estudar;
- Identificação do polimorfismo genético a estudar;
- Determinar a sequência do gene;
- Analisar as características dos participantes;
- Concluir com a análise dos resultados.

Este estudo deve aplicar-se a doentes que estejam inscritos na consulta de HTA da Unidade Local de Saúde Cova da Beira (ULS Cova da Beira).

### 3. Metodologia

Para a extensa pesquisa bibliográfica, foi utilizada a plataforma *PubMed* desde o período de maio de 2023 a novembro de 2023. O objetivo foi atualizar o conhecimento sobre o tema e explorar outros projetos relacionados com o mesmo. Nesta plataforma a pesquisa foi realizada últimos 5 anos, de forma a selecionar os artigos mais recentes acerca do tema, no entanto fez-se também uma pesquisa mais abrangente, englobando cerca de 10 anos no total. Foram também consultadas *guidelines* utilizadas no tratamento da HTA, bem como consultadas características farmacológicas do fármaco selecionado no INFARMED.

Para a identificação geral dos genes que influenciam a resposta aos fármacos anti-hipertensivos foram analisados artigos de revisão sobre o tema. Para avaliar o impacto dos genes nos fenótipos de resposta farmacológica, e o impacto no tratamento farmacológico também foram analisados artigos, e com base nestes, foram selecionados um fármaco e um gene candidato a estudar.

Depois de selecionado o fármaco específico, foi necessário selecionar pacientes da consulta de HTA da ULS Cova da Beira cuja terapêutica anti-hipertensiva incluía o fármaco escolhido, a Amlodipina. O laboratório hospitalar da ULS Cova da Beira colhe uma amostra de sangue em tubo de colheita EDTA que é de seguida transportado para o laboratório do Centro de Investigação em Ciência da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI).

No CICS-UBI é realizado o estudo genético que envolve a extração do material genético, a quantificação e a amplificação por PCR. (33) Posteriormente é realizada uma purificação de forma a remover as impurezas da PCR e garantir a qualidade da próxima etapa, que é a sequenciação. Após obtidos os resultados da sequenciação pode-se então identificar polimorfismos no gene candidato escolhido.

#### 3.1. Identificação, avaliação e análise dos genes que influenciam a resposta aos fármacos anti-hipertensivos

Os polimorfismos genéticos podem influenciar a resposta aos medicamentos anti-hipertensivos, influenciando genes associados à patogénese da hipertensão, modificando as interações entre medicamentos e genes e afetando polimorfismos em enzimas metabolizadoras de medicamentos, genes transportadores de medicamentos e genes envolvidos em reações metabólicas complexas. (16) Desta variabilidade genética pode decorrer uma alteração na atividade do fármaco, seja a sua diminuição, aumento, ausência e, em certos casos, manutenção. (34) Além disso, sugere-se que a resposta aos fármacos está ligada a características complexas, poligénicas e multifatoriais, representando desta forma um verdadeiro desafio na identificação de genes específicos. (16) Resumindo, a variabilidade interindividual pode ser a causa de uma

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

resposta heterogênea quando é realizado um mesmo tratamento farmacológico. Estudos realizados têm revelado que uma parte significativa da variabilidade interindividual na resposta à terapêutica anti-hipertensiva está relacionada com fatores genéticos, nomeadamente SNPs encontrados em pacientes hipertensos, conforme explorado no subcapítulo **1.7. Variabilidade interindividual genética na resposta à terapêutica da HTA.**

Os genes identificados podem exercer um impacto significativo nos fenótipos da resposta farmacológica. Contudo, é crucial observar que a reação aos medicamentos é complexa e multifactorial, e a influência de um único gene podendo ser limitada. (16) Para melhor compreensão da interação entre os polimorfismos genéticos e a resposta farmacológica enunciam-se alguns dos SNPs identificados em estudos realizados, o fármaco com que interagem e em que consiste a alteração na resposta farmacológica.

### 3.1.1. Estudos sobre a farmacogenómica da HTA

Dado que as respostas da PA aos BCC são amplamente variáveis, estudos têm investigado potenciais polimorfismos genéticos que possam contribuir para esta variabilidade. De acordo com o mecanismo de ação do BCC, na tabela 2 podem ver-se alguns resultados obtidos em pesquisas relacionadas com polimorfismos genéticos que possam ter impacto nas respostas anti-hipertensivas aos BCC ou no risco de resultados cardiovasculares adversos.

<b>Resumo de estudos sobre farmacogenómica dos BCC</b>					
<b>Fármaco</b>	<b>Gene</b>	<b>SNP</b>	<b>População em Estudo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Ref.</b>
Verapamil	CACNB2	rs2357928	Caucasianos	Pacientes com o genótipo GG tratados com verapamil têm maior risco de eventos cardiovasculares adversos	(35) (36)
Amlodipina	CACNA1C	rs2239050	Caucasianos	Portadores do genótipo GG têm melhor resposta da PA à amlodipina	(37)
	CYP3A4	T16090C rs2246709	Afroamericanos	Portadores do alelo C têm melhor resposta da	(38)

Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

				PA à amlodipina	
		CYP3A4*1B, -392A/G, rs2740574		Mulheres portadoras de um alelo A têm 3 vezes mais probabilidade de atingir uma PAM alvo de 107 mmHG	(38)
Diltiazem	PLCD3	rs12946454	Caucasianos	Portadores do genótipo TT têm melhor resposta ao tratamento com diltiazem	(39)

Tabela 2 – Resumo de estudos sobre farmacogenômica dos BCC

Os fármacos que visam o sistema renina-angiotensina são amplamente prescritos para tratar a HTA. São os IECAs e os ARA II que modulam o SRAA antagonizando o efeito da angiotensina II. Não surpreendentemente, os genes que codificam os componentes do SRAA são os candidatos mais prováveis para uma abordagem farmacogenômica relacionada com estes fármacos. Pode encontrar-se na tabela 3 um pequeno resumo de estudos sobre farmacogenômica dos IECAs e ARAs.

<b>Resumo de estudos sobre farmacogenômica dos IECAs/ARA II</b>					
<b>Fármaco</b>	<b>Gene</b>	<b>SNP</b>	<b>População em Estudo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Ref.</b>
Atenolol (β-bloqueante) Lisonipril Nifedipina	ACE	Inserção/Deleção	Caucasianos	Não houve associação significativa dos polimorfismos com a resposta da PA aos fármacos atenolol (β-bloqueante), lisinopril e nifedipina	(40)
Enalapril	NOS3	-786T/C rs2070744	Pacientes brasileiros	Portadores do alelo C respondem melhor ao	(41)

Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

				enalapril	
Losartan	CAMK1D	rs10752271	Caucasianos	Portadores hipertensos do genótipo GG têm melhor resposta da PA ao losartan	(42)
	NPHS 1	349G/A rs3814995		O polimorfismo rs3814995 (Glu117Lys) está associado a melhores respostas da PA ao losartan, com diminuição da PAS	(43)

Tabela 3 - Resumo de estudos sobre farmacogenômica dos IECAs/ARA II

O diurético mais amplamente utilizado no tratamento da HTA é o diurético tiazídico hidroclorotiazida, que atua inibindo o co transportador de NaCl expresso no túbulo contorcido distal do nefrônio. (44) Dada a substancial variação interindividual nas respostas anti-hipertensivas à hidroclorotiazida, um grande número de estudos avaliou polimorfismos genéticos como preditores das respostas da pressão arterial a este fármaco (tabela 4).

<b>Resumo de estudos sobre farmacogenômica dos Diuréticos</b>					
<b>Fármaco</b>	<b>Gene</b>	<b>SNP</b>	<b>População em Estudo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Ref.</b>
Hidroclorotiazida	ADD1	Gly460Trp rs4961	Caucasianos	Portadores do alelo Trp têm níveis mais reduzidos de renina e uma melhor resposta ao tratamento com hidroclorotiazida	(45)
				Mudanças no transporte iônico através da	(46)

Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

				membrana celular com consequente diminuição da PA nos portadores de alelo Trp	(47)
				Portadores do alelo 460Trp têm melhor resposta à hidroclorotiazida	
	GNB3	C825T rs5443	Afroamericanos e Caucasianos	Portadores do alelo T têm melhor resposta à hidroclorotiazida	(48)
	NEED4L	G/A rs4149601	Caucasianos	Portadores do alelo G têm melhor resposta à hidroclorotiazida	(49)
rs4149601 e rs292449		Caucasianos	Portadores do haplotipo G-C têm melhor resposta à hidroclorotiazida	(50)	

Tabela 4 - Resumo de estudos sobre farmacogenômica dos Diuréticos

Apesar de não se considerar os  $\beta$ -bloqueantes como a terapia farmacológica anti-hipertensiva de primeira linha, conforme descrito no capítulo introdutório, estes fármacos continuam a ser amplamente prescritos e mantêm um lugar importante no tratamento da HTA nalguns subgrupos de pacientes. O alvo principal dos  $\beta$ -bloqueadores é o recetor  $\beta_1$ -adrenérgico, codificado por ADRB1. Este gene contém dois polimorfismos genéticos comuns e amplamente estudados: rs1801252, que leva a uma mudança de serina para glicina na posição 49 da proteína (Ser49Gly), e rs1801253, que resulta numa mudança de arginina para glicina na posição 389 da proteína (Arg389Gly). Estes dois polimorfismos mostram evidências importantes de impacto funcional, uma vez que afetam a sinalização intracelular mediada pelo recetor  $\beta_1$ -adrenérgico.

Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

Na tabela 5 pode observar-se um resumo de estudos sobre a farmacogenômica dos  $\beta$ -bloqueantes.

<b>Resumo de estudos sobre farmacogenômica dos <math>\beta</math>-bloqueantes</b>					
<b>Fármaco</b>	<b>Gene</b>	<b>SNP</b>	<b>População em Estudo</b>	<b>Resultados</b>	<b>Ref.</b>
Bisoprolol	ADRB1	rs1801252	Caucasianos	Homozigotos Ser49Gly mostraram tendência não significativa de ter uma resposta mais forte ao bisoprolol	(51) (52)
Metoprolol	ADRB1	Arg389Gly rs1801253	Caucasianos, Afroamericanos e Hispânicos	Portadores do genótipo Arg/Arg têm melhor resposta da PA ao metoprolol	(53)
	FGD5	rs294610	Caucasianos	Portadores do alelo A têm melhor resposta da PA ao metoprolol	(54)
$\beta$ -bloqueante	SLC25A31	rs201279313	Afroamericanos	Pacientes heterozigóticos têm melhor resposta antihipertensiva aos $\beta$ -bloqueantes	(55)
	BST1	rs28404156	Caucasianos	Portadores do alelo A têm melhor resposta da PA aos $\beta$ -bloqueantes	(56)

Tabela 5 - Resumo de estudos sobre farmacogenômica dos  $\beta$ -bloqueantes

Traduzir as descobertas da pesquisa para a prática clínica, com a finalidade de melhorar a terapêutica da HTA continua a ser um desafio. Uma estratégia baseada em farmacogenómica que seja eficiente para orientar os pacientes com HTA para um regime de tratamento mais eficaz e bem tolerado seria extremamente valiosa.

### **3.2. Projeto para análise da variabilidade interindividual na resposta a um fármaco anti-hipertensor**

Com o propósito de compreender a variabilidade genética na resposta ao tratamento anti-hipertensivo, este projeto foca-se na avaliação da influência de polimorfismo genéticos sobre a eficácia de um determinado fármaco a escolher, em pacientes da consulta de HTA da ULS Cova da Beira. Para atingir este objetivo, delinearam-se passos específicos que abrangem a seleção do fármaco, a identificação do gene candidato e escolha do polimorfismo relevante. Estas etapas fundamentais visam fornecer critérios importantes para a relação entre a genética individual e a resposta ao tratamento, contribuindo assim para uma abordagem mais personalizada no tratamento da HTA. Detalham-se seguidamente os passos do projeto.

#### **3.2.1. Escolha do fármaco específico para ser investigado**

O fármaco escolhido para a realização deste projeto foi a amlodipina. Esta escolha é motivada pela sua ampla utilização na terapêutica anti-hipertensiva atualmente em Portugal. A amlodipina pertence à classe dos BCC e é frequentemente prescrita pela sua eficácia comprovada e pelo perfil de segurança que apresenta. O facto de ser usada em Portugal também permite que o projeto tenha um número significativo de candidatos para estudos genéticos.

Mais informações acerca deste fármaco em específico podem ser consultadas no subcapítulo correspondente: **1.5.3. Amlodipina.**

#### **3.2.2. Escolha do fármaco específico para ser investigado**

Depois de selecionado o fármaco para investigar, selecionou-se o gene candidato. Para este estudo escolheu-se o gene CACNA1C, localizado no cromossoma 12p13.2. O gene ocupa uma posição de aproximadamente 500 kb no genoma humano e é composto por 47 exões. Este gene codifica a subunidade  $\alpha 1C$  do canal de cálcio do tipo L. (36,57) Desta forma, o gene CACNA1C desempenha um papel crucial na regulação da entrada de cálcio nas células cardíacas e vasculares.

Ao escolher o gene CACNA1C como alvo de investigação, deve focar-se na interação específica da amlodipina com este canal de cálcio. Esta escolha estratégica visa aprofundar a compreensão de como é que as variações genéticas podem influenciar a resposta à terapêutica. Ao explorar mais detalhadamente a função do gene CACNA1C na resposta à amlodipina, espera extrair-se informação interessante que tenha o potencial de aprimorar as estratégias de tratamento

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

individualizado, quem sabe, culminando numa gestão mais eficiente da HTA. Essa abordagem visa ampliar conhecimento para a otimização de abordagens terapêuticas direcionadas e personalizadas.

### **3.2.3. Identificação do polimorfismo genético a estudar**

O polimorfismo genético selecionado para análise neste estudo foi o rs1051375 do gene candidato CACNA1C. A finalidade é verificar se existem indícios de que a existência de variações neste polimorfismo podem influenciar a eficácia dos fármacos BCC, nomeadamente da Amlodipina, na redução da PA. Para a variação rs1051375 do gene CACNA1C analisaremos a possibilidade da existência de genótipos com melhor resposta ao fármaco amlodipina. (44,58)

Ao aprofundar a investigação deste polimorfismo, tem-se como objetivo obter uma melhor compreensão das interações genéticas que interferem com a resposta terapêutica ao fármaco selecionado. Este conhecimento poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias de tratamento personalizadas e eficazes, enriquecendo a gestão dos pacientes com HTA.

### **3.2.4. Características da população do estudo exploratório**

- Número da população: 8
- Seleção de pacientes: Selecionam-se pacientes que estejam inscritos na consulta de Medicina Interna - HTA da ULS Cova da Beira.
- Critérios de inclusão:
  - Indivíduos diagnosticados com hipertensão arterial essencial ligeira a moderada (PAS  $\geq 140$  e  $\leq 180$  mmHg e PAD  $\geq 90$  e  $\leq 110$  mmHg)
  - Indivíduos com idade  $\geq 18$  anos
  - Indivíduos seguidos em consulta de Medicina Interna na ULS Cova da Beira
  - Indivíduos que estejam a tomar Amlodipina em Monoterapia ou associada a outros fármacos anti-hipertensores
- Critérios de exclusão:
  - Indivíduos diagnosticados com hipertensão arterial secundária
  - Indivíduos com idade  $< 18$  anos
- Procedimentos necessários: Utilização de amostras de sangue recolhidas aquando das análises de rotina. Para a recolha das amostras não será necessário realizar procedimentos extra aos já realizados para o tratamento e acompanhamento da doença. Os materiais biológicos (sangue) utilizados como amostras para este estudo serão descartados no final.
- Características a avaliar - Avaliar e descrever em consulta características que possam constituir fatores confundidores:
  - IMC, sexo, idade, fumadores, dieta, EAM prévio, uso de nitratos, uso de estatinas.

Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

### **3.2.5. Informação relevante para os participantes estudar**

Direitos dos participantes: desistir da participação no presente estudo a qualquer momento; ter acesso à informação obtida através das várias análises (sanguíneas e genéticas) e à solicitação da sua remoção; obtenção de uma cópia do Consentimento Informado.

Potenciais riscos: nenhum, visto que as análises genéticas serão feitas utilizando as amostras obtidas das análises de rotina e/ou do tratamento.

Potenciais benefícios: permitir a otimização da terapêutica individual.

Informação a ser recolhida: IMC, sexo, idade, dieta para HTA, antecedentes pessoais (enfarte agudo do miocárdio prévio), medicação habitual, *ratio* entre colesterol total/HDL, sequenciação genética do gene CACNA1C.

Quem tem acesso à informação: investigador principal (Dr. Miguel Castelo Branco) e estudante do Mestrado Integrado em Medicina.

Armazenamento da informação: base de dados da ULS Cova da Beira.

Armazenamento da amostra sobranete: apenas o tempo suficiente para se repetir o doseamento, caso necessário. Será destruída assim que o trabalho ficar completo.

Informações dos investigadores e supervisores: ver Anexo 1.

### **3.2.6. Determinação do genótipo da população estudar**

A análise genética será realizada numa amostra de sangue que é colhida no início do estudo. É realizada nessa amostra sanguínea a extração de ácido desoxirribonucleico (ADN), amplificação e sequenciação do gene candidato escolhido, CACNA1C, para análise do polimorfismo rs1051375 e verificar a sua possível influência no controlo da PA.

O *website* <https://www.ensembl.org/> é um navegador de genomas que fornece uma plataforma de procura e análise de informações genómicas abrangentes, bastante útil para diversos fins em estudos genéticos. Este recurso permite visualizar a estrutura e organização dos cromossomas, incluindo genes, regiões reguladoras e outras características genéticas. Para este estudo em específico, o *ensembl* é utilizado para localizar o gene CACNA1C no genoma humano. Verifica-se através do *website* a localização do gene no cromossoma e analisa-se a sua estrutura. Pesquisando o polimorfismo rs1051375 obtém-se informações sobre a sua localização e possíveis efeitos funcionais.

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

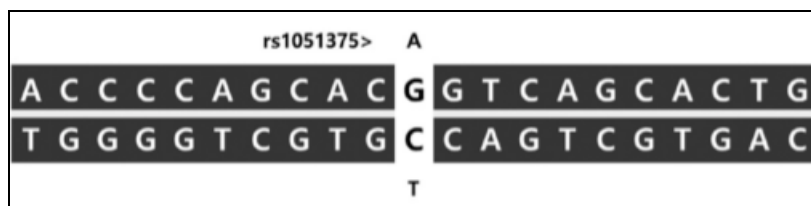


Figura 1 – SNO no rs1051375, adaptado de (58)

Numa fase inicial, no CICS-UBI é então realizada a extração de ADN. Conforme mencionado anteriormente, o sangue foi colhido por punção venosa para tubos de EDTA na ULS Cova da Beira e, depois de transportado para o laboratório do CICS-UBI, o ADN genómico é isolado utilizando o *kit Wizard Genomic DNA purification (Promega)* de acordo com as instruções do fabricante, tendo sido posteriormente armazenado a 4°C. (ver anexo 2)

Após a extração pode então dar-se início à genotipagem. A genotipagem do polimorfismo CACNA1C rs1051375 é realizada por PCR convencional. A amplificação dos fragmentos contendo o polimorfismo em estudo é realizada num volume total de 50 µL usando um termociclador *MyCycler (Bio-Rad)*. Esse volume total contém 10 pmol de cada *primer (forward 5'-ACCCCTCCTTCTTGCCTACA-3' e reverse 5'-CTGCCAGGTCTGATCAAGGG-3')*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 nM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs NZYSet da Nzytech), 1 unidade de ADN polimerase NZYTaQ II (Nzytech) e 100 ng de ADN genómico. (33,58)

O protocolo da amplificação é o seguinte: desnaturação inicial a 93°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, *annealing* a 55°C por 30 segundos e alongamento a 72°C por 30 segundos. A extensão final é a 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos amplificados por PCR do gene CACNA1C são sequenciados através de sequenciamento *Sanger* (realizado pela empresa STABVIDA). Os dados sequenciados são posteriormente analisados no programa *ChromasPro* que é um *software* de análise de sequências de ADN que permite visualizar, editar e analisar sequências de ADN. O gráfico que o *ChromasPro* gera é um cromatograma, uma representação gráfica da sequência de ADN. (59)

Os materiais utilizados são:

- Materiais para o gel de agarose: Agarose (GRS Agarose LE da GRISP), *GreenSafe (GreenSafe Premium da Nzytech)*, marcador de pesos moleculares (100bp *GeneRuler 100 bp DNA Ladder - ThermoFisher Scientific*).
- Enzimas utilizadas para purificar: ExoI (Exonuclease I da *ThermoFisher Scientific*) FastAP (*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase da ThermoFisher Scientific*) (ver anexo 3).

## 4. Resultados e Discussão

Neste capítulo, serão apresentados os resultados da análise do polimorfismo rs1051375 do gene CACNA1C em relação à resposta à amlodipina na população estudada. A análise será realizada através da comparação dos diferentes genótipos (AA, AG e GG) e da sua associação com a redução da PA após o tratamento com a amlodipina.

### 4.1. Análise de resultados

Inicialmente, acedeu-se ao *website ensembl.org* e localizou-se o gene CACNA1C no genoma humano. Através dos *primers* (sublinhados a amarelo na figura 2) fomos procurar a sequência genética. Localizou-se a região de início de transcrição, e conclui-se que precede o exão 42 (letras azuis na figura 2). Antes do *primer* temos a região intrónica, a cinzento na figura 2.

**Gene:** CACNA1C

**Polimorfismo:** rs1051375

Exão42

```
tctctggagcagccaggcatgaagaaggtcctcagggtgctcctggctcccagcagggtgtgctaccgaaagaaggcagcccgcctcccaggccctgcacttccctgacc
tggctgtggaggctgctctctgggaggagtgggtgctaaggggcttctccaccaccctctctctgctctacagAGGGCCGGTGGCCTGTTTCGGCAACCAC
GTCAGCTACTACCAAAGCGACGGCCGGAGCGCCTTCCCCAGACCTTACCACCTCAGCGCCCGCTGCACATCAACAAG
GCGGGCAGCAGCCAGGGCGACACTGAGTCGCCATCCCACGAGAAGCTGGTGGACTCCACCTTACCCCGAGCAGCTAC
TCGTCCACCGGCTCCAACGCCAACATCAACAACGCCAACACCCGCCCTGGGTGCGCTCCCTCGCCCCGCCGGCTACC
CCAGCACGGTCAGCACTGTGGAGGGCCACGGGCCCCCTTGTCCCTGCCATCCGGGTGCAGGAGGTGGCGTGAAG
CTCAGCTCCAACAGgtaagtgggaggctggccacccaggcgccacacaggggcccagtgctgcaacctcaggagacagtgaggagagcaggagcctcgccca
gccacttgcctcaagctccaggagggtgctgccccagactccagcaagagcaggaggcactatgctgtctccaagtctgccctgacagaccggcagctcagggca
```

Figura 2 – Exão 42 que contém o polimorfismo rs1051375 – G vermelho

Pesquisou-se ainda o polimorfismo rs1051375 (identificado pela letra G vermelha na figura 2) e obteve-se informações sobre a sua localização e possíveis efeitos funcionais. Desta forma, na figura 3 verifica-se a localização e verifica-se que se encontra na *forward strand*, ou seja, no sentido 5' → 3'. Podem ainda ver-se as mutações possíveis (alelos G/A/C).

Variation: rs2153803935		Variation: rs1051375	
Class	Indel	Class	SNP
Source	dbSNP	Source	dbSNP
Location	12:2679699-2679738	Location	12:2679713
Alleles	GGTACCCCA... (Forward strand)	Alleles	G/A/C (Forward strand)
cDNA position	5923	cDNA position	5937
Protein position	1783	Protein position	1787
Amino acids	GYPSTVSTVE...P/G...	Amino acids	T/T/T
Codons	GGTACCCCA...c/G...	Consequences	synonymous variant
Consequences	frameshift variant		

Figura 3 – Características do polimorfismo rs1051375

Para a extração do ADN colocou-se 300uL do tubo no *endorf* e seguiu-se os passos do protocolo de extração. Depois quantificou-se a amostra no *nanodrop*. Após a extração e amplificação do

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

ADN genómico, verificou-se que o fragmento de ADN amplificado tinha 567 pares de bases, calculado do *primer forward* até o *primer reverse*. Os produtos da PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (figura 4) com um marcador de pares de base de 0 a 1000. (33)

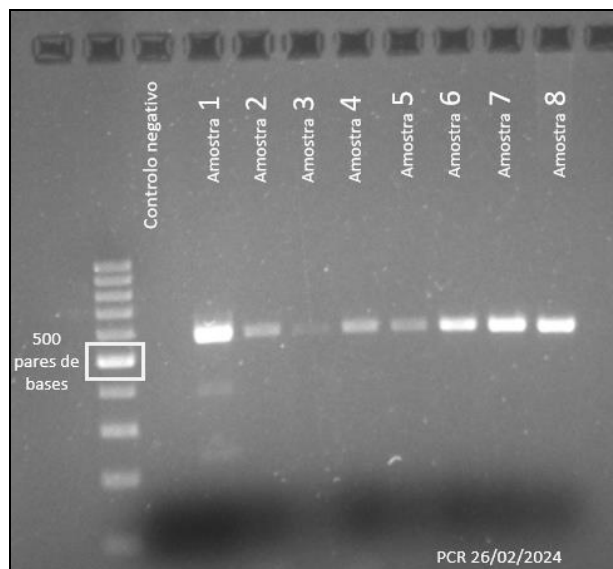


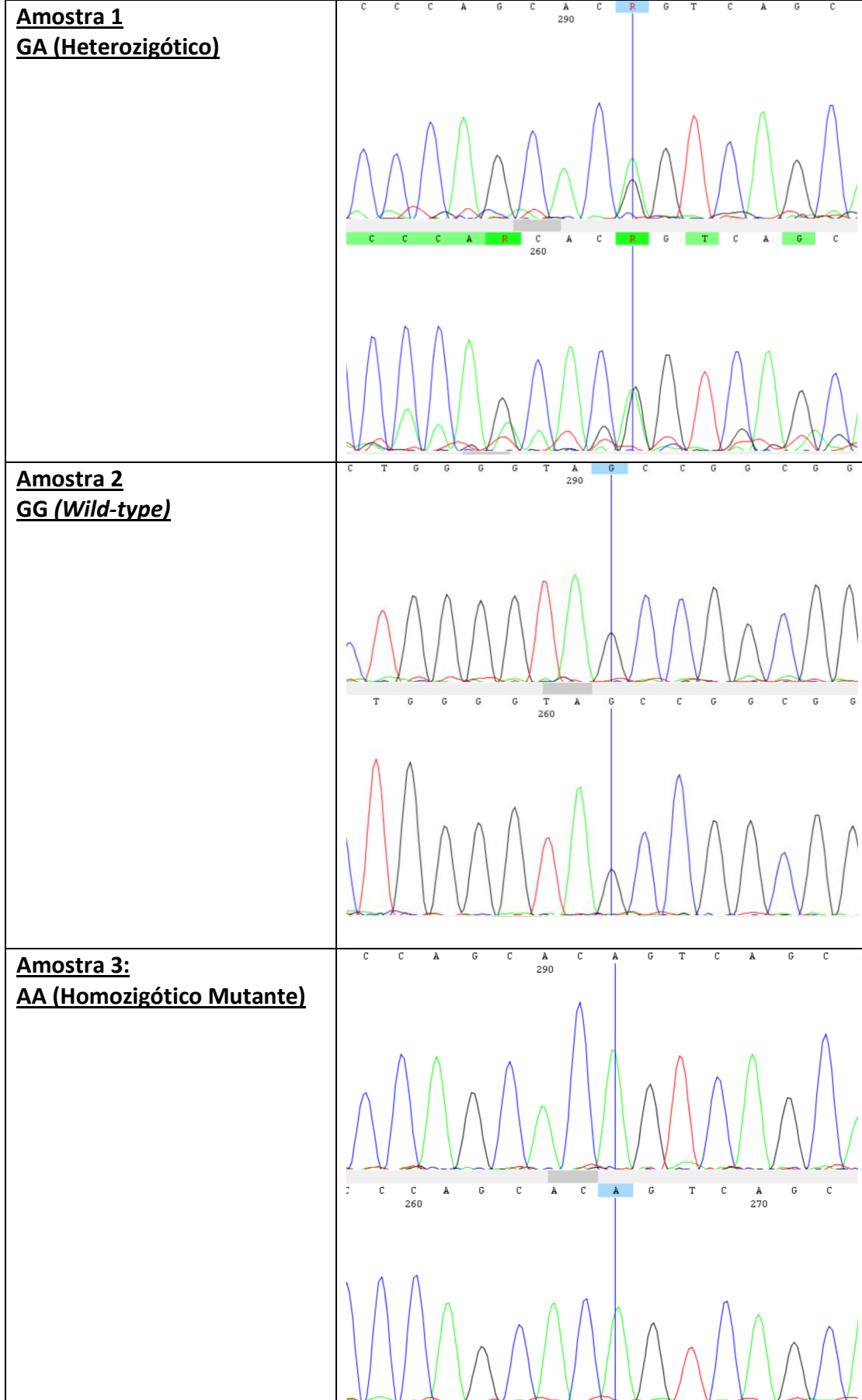
Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% a confirmar as cerca de 567 pares de bases do ADN amplificado

A eletroforese apresenta o controlo negativo limpo conforme se verifica na figura 4. Na amostra 1 existem mais bandas presentes, além da mais intensa que confirma as cerca de 567 pares de base, mas tal deve-se a contaminação com proteínas. A purificação do ADN foi realizada de modo a eliminar o máximo de contaminação possível e os tubos foram preparados de acordo com as indicações da empresa STABVIDA. (33)

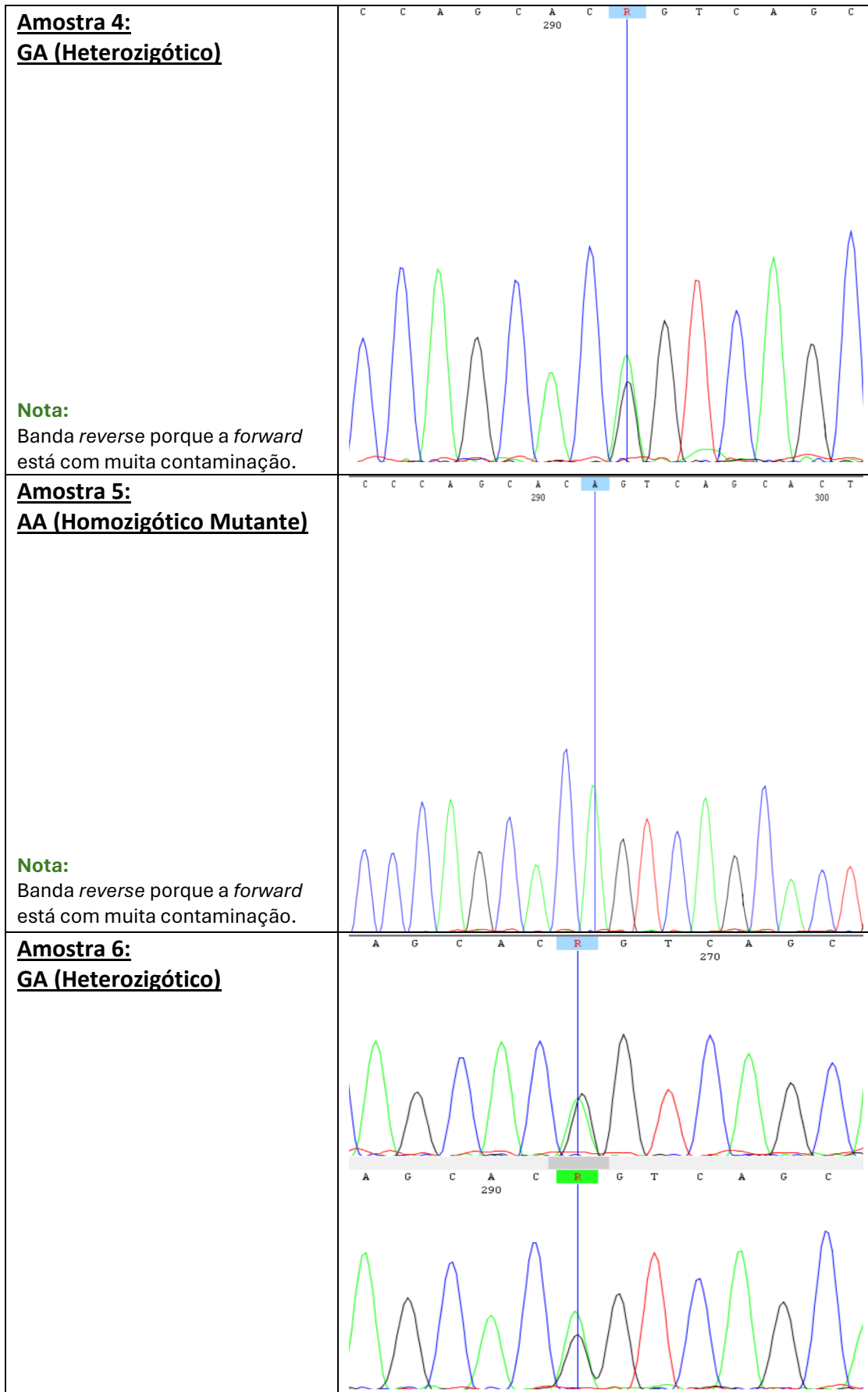
Os fragmentos amplificados por PCR do gene *CACNA1C* foram sequenciados através de sequenciamento *Sanger* (realizado pela empresa STABVIDA). Para a empresa enviaram-se 2 tubos por amostra, um que incluía o *primer forward* e outro com o *primer reverse*.

Os dados sequenciados que foram analisados no programa ChromasPro são apresentados de seguida.

Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina



Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina



Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

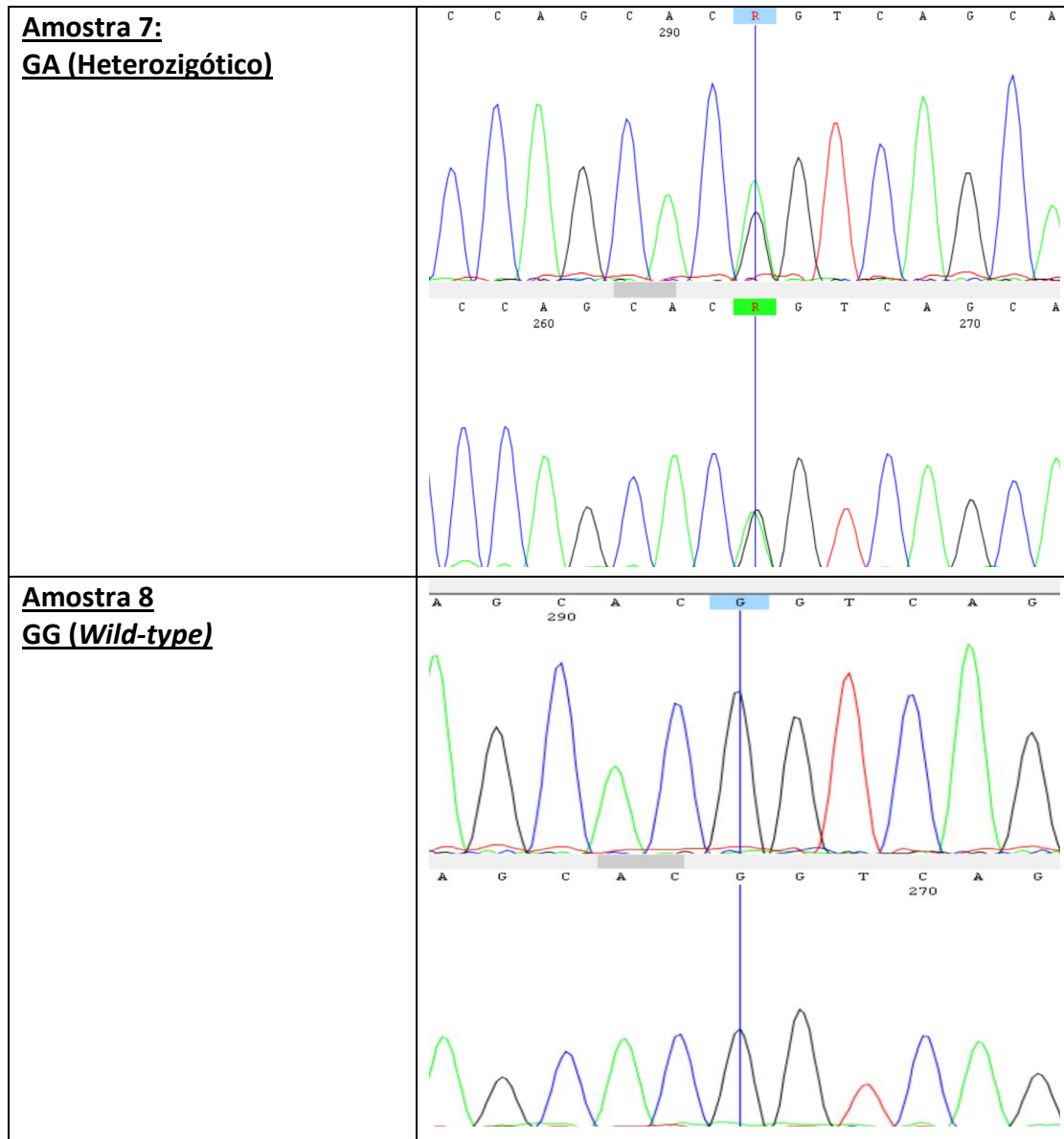


Tabela 6 - Representações gráficas da sequenciação de ADN – Obtido em ChromasPro (59)

O cromatograma criado pelo *ChromasPro* é composto por uma série de picos, cada um dos quais representa um nucleótido (A – adenina, G – guanina, C – citosina, T – tiamina). O eixo x representa a posição do nucleótido na sequência de ADN e o eixo y representa a intensidade do sinal. Relativamente aos nucleótidos, podemos verificar que os picos verdes correspondem à adenina, os pretos à guanina, os vermelhos à tiamina e os azuis à citosina. A linha de base indica representa o nível de “ruído de fundo” no cromatograma. (59)

O *wild type* é a forma mais comum de um gene numa população natural. Ou seja, é a versão do gene que a maioria dos indivíduos da mesma espécie possui, e que neste caso é o homozigoto GG.

Simplificando a tabela 6 obtém-se o seguinte resultado:

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

Amostra	Resultado da Sequenciação
1	GA – Heterozigótico
2	GG – <i>Wild-Type</i>
3	AA – Homozigótico Mutante
4	GA – Heterozigótico
5	AA – Homozigótico Mutante
6	GA – Heterozigótico
7	GA – Heterozigótico
8	GG – <i>Wild-Type</i>

Tabela 7 – Resultados da Sequenciação

Concluindo, nas 8 amostras, temos 2 *wild-type*, 2 homozigóticos mutantes AA e 4 heterozigóticos GA.

### 4.1. Análise da resposta à amlodipina

Este estudo tem como objetivo analisar a variabilidade interindividual na resposta à amlodipina, um anti-hipertensivo de uso frequente, em 8 pacientes da consulta de HTA da ULS Cova da Beira. O objetivo é o de avaliar a influência do polimorfismo rs1051375 do gene CACNA1C na eficácia do fármaco.

As conclusões do estudo baseiam-se na análise de características dos participantes, incluindo idade, sexo, comorbilidades, histórico de HTA, tratamento anti-hipertensivo e genótipo do polimorfismo rs1051375. Apresentam-se as principais características dos 8 participantes:

Amostra	Características
1	Feminino, 71 anos – PA controlada
	Seguida por HTA desde 1998
	Comorbilidades – Diabetes <i>Mellitus</i> 2, Dislipidemia, Hipotiroidismo
	Amlodipina 5 mg – desde 2009
2	Masculino, 76 anos – PA controlada
	Seguido por HTA desde 2017
	Comorbilidades – Doença Renal Crónica e Dislipidemia
	Perindopril 4mg + Indapamida 1,25mg + Amlodipina 5mg
3	Feminino, 74 anos – atualmente PA controlada
	HTA de difícil controlo em 2017

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

	Comorbilidades – Dislipidemia
	Perindopril 10mg + Indapamida 2,5mg + Amlodipina 5mg
4	Feminino, 74 anos – atualmente PA controlada
	Seguida por HTA desde 1998 Apresentou crises hipertensivas em 2015 e PA descontrolada
	Comorbilidades – Dislipidemia e Diabetes <i>Mellitus</i> 2
	Perindopril 10mg + Indapamida 2,5mg + Amlodipina 5mg
5	Masculino, 27 anos – PA controlada
	HTA desde 2002
	HTA 2ª – Causa em investigação – Aguarda TC das suprarrenais
	Perindopril 10mg + Amlodipina 5mg
6	Masculino, 63 anos – PA controlada
	Seguimento por HTA desde 2004
	Sem comorbilidades conhecidas
	Perindopril 8mg + Indapamida 2,5mg + Amlodipina 5mg
7	Masculino, 72 anos – PA controlada desde 2019
	Seguido por HTA desde 1998 TA em 2015 mal controlada – MGF ajustou medicação
	Comorbilidades – Diabetes <i>Mellitus</i> 2 mal controlada
	Amlodipina 5mg e Ramipril 5mg
8	Masculino, 68 anos – PA controlada
	Seguimento por HTA desde 2018 (processo anteriormente seguido na França)
	Comorbilidades – Dislipidemia e Diabetes <i>Mellitus</i> 2
	Perindopril 8mg + Indapamida 2,5mg + Amlodipina 5mg

Tabela 8 – Características dos 8 participantes no estudo

A idade dos participantes varia entre 27 e 76 anos, com média de aproximadamente 66 anos e a maioria dos participantes é do sexo masculino (5 do total de 8 participantes - 62,5%). Pode observar-se que a faixa etária dos participantes é essencialmente contida entre os 63 e os 76 anos, exceto do participante com a amostra 5 que tem 27 anos. Este participante, contudo, representa uma possível amostra a excluir, caso se confirme que apresenta um dos critérios de

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

exclusão, que é o facto de poder ser diagnosticado com HTA secundária. Atualmente, ainda se encontra em estudo e aguarda a realização de uma tomografia das glândulas suprarrenais.

A maioria dos participantes apresenta comorbilidades, incluindo diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia, doença renal crónica e hipotireoidismo. A HTA está presente há mais de 5 anos na maioria dos casos, sendo que 3 dos participantes apresentam HTA de difícil controlo. Conforme as diretrizes do estudo, todos os participantes tomam amlodipina (coincidentalmente todos na dose mínima de 5mg), podendo ser em monoterapia ou associado a outros anti hipertensores, o que é mais frequente.

Uma breve análise preliminar sugere que os genótipos podem influenciar na resposta à amlodipina. Ao verificar os resultados, e apesar de não ter significância estatística, pode realçar-se que os participantes 3, 4 e 7, são portadores do alelo mutante e apresentaram PA de difícil controlo. No entanto, seriam necessários mais estudos com um número maior de participantes para confirmar esta associação.

Amostra	Alelos	Características	Controlo da HTA
3	AA – Homozigótico Mutante	Feminino, 74 anos atualmente PA controlada	<b>HTA de difícil controlo em 2017</b>
4	GA – Heterozigótico	Feminino, 74 anos atualmente PA controlada	<b>Apresentou crises hipertensivas em 2015 e PA descontrolada</b>
7	GA – Heterozigótico	Masculino, 72 anos – PA controlada desde 2019	<b>TA em 2015 mal controlada MGF ajustou medicação</b>

Tabela 9 – Participantes que apresentaram PA de difícil controlo

O estudo apresenta resultados preliminares interessantes sobre a variabilidade interindividual na resposta à amlodipina. A análise do polimorfismo rs1051375 do gene CACNA1C pode ser útil para a personalização do tratamento da HTA. No entanto, conforme mencionado, serão necessários mais estudos e informações para confirmar os resultados e aprofundar o conhecimento sobre a relação entre genética e a resposta à toma de amlodipina. Obter registos de medição da pressão arterial dos últimos 5 anos dos pacientes em estudo seria interessante para avaliar o perfil tensional e verificar se outros fármacos foram tomados antes da amlodipina e se estes não tiveram sucesso no controlo da pressão arterial.

Ao longo do desenvolvimento do projeto, foi possível otimizar o circuito de trabalho em todas as suas etapas. Desde a seleção dos participantes e organização da recolha de sangue no laboratório, passando pela conservação das amostras, transporte até ao centro de investigação e subsequente sequenciação. Cada etapa foi cuidadosamente analisada e aprimorada. Através de um processo rigoroso de otimização, conseguiram-se aperfeiçoar as técnicas e procedimentos, garantindo a qualidade e eficiência do projeto. Como resultado, o projeto encontra-se agora pronto para ser aplicado em larga escala, com a certeza de que os resultados obtidos poderão ter um impacto positivo.

## 5. Conclusões e Perspetivas Futuras

A farmacogenómica na HTA surge como uma ferramenta promissora para o futuro da medicina. A necessidade de combinações de medicamentos para controlar a PA em muitos pacientes torna crucial a realização de estudos focados nessas combinações, aproximando a farmacogenómica da prática clínica.

Embora a ausência de efeitos colaterais graves com os anti-hipertensivos possa explicar a falta de ímpeto pela personalização da medicina na área, essa postura leva à administração empírica de medicamentos, nem sempre a mais eficaz. A otimização terapêutica proporcionada pela farmacogenómica poderia resultar numa redução do número de consultas para ajuste do tratamento e numa menor quantidade de medicamentos por paciente, tornando a abordagem mais rentável do que o método de tentativa e erro, alcançando um controlo mais eficaz da PA. A longo prazo, pode resultar em prevenção de eventos adversos cardiovasculares e renais culminando numa melhoria da qualidade de vida e longevidade dos pacientes com HTA.

O presente estudo investigou a influência do polimorfismo rs1051375 do gene CACNA1C na resposta à amlodipina em 8 pacientes com HTA da ULS Cova da Beira. Os resultados preliminares sugerem que o genótipo do polimorfismo pode estar associado à resposta ao tratamento. No entanto, o número de participantes é pequeno e são necessárias mais pesquisas para confirmar estes resultados. Recomenda-se então que em futuros estudos ampliem o número de participantes, de forma a ser possível colher mais dados e mais detalhados e ainda analisar outros polimorfismos que possam influenciar na resposta à amlodipina.

Este estudo contribui para a compreensão da variabilidade interindividual na resposta à amlodipina e abre caminho para pesquisas futuras que podem levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais personalizadas para o tratamento da hipertensão arterial. A farmacogenómica emerge como um paradigma transformador da medicina do futuro, permitindo que os médicos personalizem tratamentos com base no perfil genético individual de cada paciente. Esta abordagem inovadora abre portas a uma série de benefícios, entre os quais, o aumento do sucesso terapêutico, a redução de efeitos secundários e até mesmo desenvolvimento de novos medicamentos, através da identificação de novos alvos terapêuticos.

Ao otimizar o tratamento da HTA, a farmacogenómica tem o potencial de transformar a vida dos pacientes, proporcionando um futuro mais saudável e com melhor qualidade de vida. Conclui-se então que a farmacogenómica tem o potencial de melhorar significativamente a qualidade dos cuidados de saúde, tornando os tratamentos mais eficazes, seguros e personalizados para cada paciente.

## 6. Bibliografia

1. Marta Barreto, Vânia Gaio, Irina Kislaya, Liliana Antunes, Ana Paula Rodrigues, Ana Clara Silva, et al. 1º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico. Lisboa: INSA IP, 2016; 2015.
2. Jordan J, Kurschat C, Reuter H. Arterial hypertension-diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2018 Aug 20;115(33-34):557-8.
3. Polonia J, Martins L, Pinto F, Nazare J. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: Changes over a decade the PHYSA study. *J Hypertens.* 2014;32(6):1211-21.
4. Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. Vol. 39, *European Heart Journal.* Oxford University Press; 2018. p. 3021-104.
5. Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cífková R, Dominiczak AF, et al. Hypertension. Vol. 4, *Nature Reviews Disease Primers.* Nature Publishing Group; 2018.
6. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. Vol. 33, *Journal of Veterinary Internal Medicine.* Blackwell Publishing Inc.; 2019. p. 363-82.
7. Rossier BC, Bochud M, Devuyst O. The hypertension pandemic: An evolutionary perspective. Vol. 32, *Physiology.* American Physiological Society; 2017. p. 112-25.
8. Hendriks ME, Wit FWNM, Roos MTL, Brewster LM, Akande TM, de Beer IH, et al. Hypertension in Sub-Saharan Africa: Cross-sectional surveys in four rural and urban communities. *PLoS One.* 2012 Mar 12;7(3).
9. Ondimu DO, Kikui GM, Otieno WN. Risk factors for hypertension among young adults (18-35) years attending in tenwek mission hospital, Bomet county, Kenya in 2018. *Pan African Medical Journal.* 2019;33.
10. Manosroi W, Williams GH. Genetics of Human Primary Hypertension: Focus on Hormonal Mechanisms. Vol. 40, *Endocrine Reviews.* Endocrine Society; 2018. p. 825-56.
11. Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, Ng M, Biryukov S, Marczak L, et al. Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115mmHg, 1990-2015. *JAMA - Journal of the American Medical Association.* 2017 Jan 10;317(2):165-82.
12. Tousoulis D. Arterial hypertension: New concepts in diagnosis and treatment? *Hellenic Journal of Cardiology.* 2020 May 1;61(3):145-7.
13. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2018 May 15;71(19):e127-248.
14. Johnson R, Dlundla P, Mabhida S, Benjeddou M, Louw J, February F. Pharmacogenomics of amlodipine and hydrochlorothiazide therapy and the quest for improved control of hypertension: a mini review. Vol. 24, *Heart Failure Reviews.* Springer New York LLC; 2019. p. 343-57.

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

15. Carneiro FS, Bomfim GF, Bruno S, Cau A, Santos Bruno A, Fedoce AG. Hypertension: a new treatment for an old disease? Targeting the immune system LINKED ARTICLES. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2019;176:2028. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.v176.12/>
16. Rysz J, Franczyk B, Rysz-Górczyńska M, Gluba-Brzózka A. Pharmacogenomics of hypertension treatment. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 1;21(13):1–26.
17. Eisenberg MJ, Brox A, Bestawros AN. Calcium channel blockers: an update. *Am J Med.* 2004 Jan 1;116(1):35–43.
18. Laurent S. Antihypertensive drugs. *Pharmacol Res.* 2017 Oct 1;124:116–25.
19. Melville S, Byrd JB. Personalized Medicine and the Treatment of Hypertension. Vol. 21, *Current Hypertension Reports.* Current Medicine Group LLC 1; 2019.
20. Burnier M, Bakris G, Williams B. Redefining diuretics use in hypertension: Why select a thiazide-like diuretic? Vol. 37, *Journal of Hypertension.* Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. 1574–86.
21. Fumagalli C, Maurizi N, Marchionni N, Fornasari D.  $\beta$ -blockers: Their new life from hypertension to cancer and migraine. 2019 [cited 2023 Sep 29]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104587>
22. Acelajado MC, Hughes ZH, Oparil S, Calhoun DA. Treatment of Resistant and Refractory Hypertension. *Circ Res.* 2019 Mar 29;124(7):1061–70.
23. Lamirault G, Artifoni M, Daniel M, Barber-Chamoux N, Nantes University Hospital Working Group on Hypertension. Resistant Hypertension: Novel Insights. *Curr Hypertens Rev.* 2019 Oct 16;16(1):61–72.
24. Shalaeva E V., Messerli FH. What is resistant arterial hypertension? Vol. 32, *Blood Pressure.* Taylor and Francis Ltd.; 2023.
25. Dunn EC, Small RE. Economics of Antihypertensive Therapy in the Elderly. 2001.
26. Syed YY. Perindopril/Indapamide/Amlodipine in Hypertension: A Profile of Its Use. Vol. 22, *American Journal of Cardiovascular Drugs.* Adis; 2022. p. 219–30.
27. Wang JG, Palmer BF, Vogel Anderson K, Sever P. Amlodipine in the current management of hypertension. Vol. 25, *Journal of Clinical Hypertension.* John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 801–7.
28. INFARMED. Resumo das Características do Medicamento - Amlodipina [Internet]. [cited 2023 Nov 2]. Available from: [https://www.infarmed.pt/documents/15786/1886316/Norvasc\\_Resumo\\_Caractersticas\\_Medicamento\\_%28RCM%29\\_Modelo.doc/db16c857-48d3-4511-85af-438e9e5c8338](https://www.infarmed.pt/documents/15786/1886316/Norvasc_Resumo_Caractersticas_Medicamento_%28RCM%29_Modelo.doc/db16c857-48d3-4511-85af-438e9e5c8338)
29. Ozemek C, Tiwari S, Sabbahi A, Carbone S, Lavie CJ. Impact of therapeutic lifestyle changes in resistant hypertension. Vol. 63, *Progress in Cardiovascular Diseases.* W.B. Saunders; 2020. p. 4–9.
30. Liu W, Frye RF, Suppiah V, Luizon MR, Pereira DA, Sandrim VC. Pharmacogenomics of Hypertension and Preeclampsia: Focus on Gene-Gene Interactions. 2018 [cited 2023 Oct 5]; Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

31. Stefanie West Leacock. Introduction to Genetics (Neely). In University of Arkansas at Little Rock; 2023. Available from: <https://LibreTexts.org>
32. Juan C Celedón, Gary M Hunninghake. Principles of complex trait genetics [Internet]. 2022 [cited 2023 Oct 23]. Available from: <https://medilib.ir/uptodate/show/14600>
33. Corporation P. Wizard(R) Genomic DNA Purification Kit Technical Manual #TM050 [Internet]. Available from: [www.promega.com](http://www.promega.com)
34. Rahman F, Muthaiah N, Kumaramanickavel G. Current concepts and molecular mechanisms in pharmacogenetics of essential hypertension. *Indian J Pharmacol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Jan 4];53(4):301. Available from: [/pmc/articles/PMC8411967/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3411967/)
35. Niu Y, Gong Y, Langae TY, Davis HM, Elewa H, Beitelshes AL, et al. Genetic Variation in the Beta 2 Subunit of the Voltage-Gated Calcium Channel (CACNB2) and Pharmacogenetic Association with Adverse Cardiovascular Outcomes in the International Verapamil SR-Trandolapril Study-Genetic Substudy (INVEST-GENES). *Circ Cardiovasc Genet* [Internet]. 2010 Dec 12 [cited 2024 Jan 11];3(6):548. Available from: [/pmc/articles/PMC3060561/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2060561/)
36. Beitelshes AL, Navare H, Wang D, Gong Y, Wessel J, Moss JI, et al. CACNA1C gene polymorphisms, cardiovascular disease outcomes and treatment response. *Circ Cardiovasc Genet* [Internet]. 2009 Aug [cited 2024 Jan 12];2(4):362. Available from: [/pmc/articles/PMC2761685/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1685/)
37. Elliott WJ, Ram CVS. Calcium Channel Blockers. *The Journal of Clinical Hypertension* [Internet]. 2011 Sep [cited 2024 Jan 11];13(9):687. Available from: [/pmc/articles/PMC8108866/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/108866/)
38. Bhatnagar V, Garcia EP, O'Connor DT, Brophy VH, Alcaraz J, Richard E, et al. CYP3A4 and CYP3A5 Polymorphisms and Blood Pressure Response to Amlodipine among African-American Men and Women with Early Hypertensive Renal Disease. *Am J Nephrol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2024 Jan 11];31(2):95. Available from: [/pmc/articles/PMC2853591/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2853591/)
39. Hamrefors V, Sjögren M, Almgren P, Wahlstrand B, Kjeldsen S, Hedner T, et al. Pharmacogenetic implications for eight common blood pressure-associated single-nucleotide polymorphisms. *J Hypertens* [Internet]. 2012 [cited 2024 Jan 11];30(6):1151–60. Available from: [https://journals.lww.com/jhypertension/fulltext/2012/06000/pharmacogenetic\\_implications\\_for\\_eight\\_common.17.aspx](https://journals.lww.com/jhypertension/fulltext/2012/06000/pharmacogenetic_implications_for_eight_common.17.aspx)
40. Konoshita T, Investigators the GDOC (G DS. Do Genetic Variants of the Renin-Angiotensin System Predict Blood Pressure Response to Renin-Angiotensin System–Blocking Drugs? A Systematic Review of Pharmacogenomics in the Renin-Angiotensin System. *Curr Hypertens Rep* [Internet]. 2011 Oct [cited 2024 Jan 11];13(5):356. Available from: [/pmc/articles/PMC3179582/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3179582/)
41. Silva PS, Fontana V, Luizon MR, Lacchini R, Silva WA, Biagi C, et al. ENOS and BDKRB2 genotypes affect the antihypertensive responses to enalapril. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 2013 Feb 17 [cited 2024 Jan 11];69(2):167–77. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00228-012-1326-2>
42. Frau F, Zaninello R, Salvi E, Ortu MF, Braga D, Velayutham D, et al. Genome-wide association study identifies CAMKID variants involved in blood pressure response to losartan: the SOPHIA

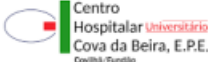
## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

- study. <http://dx.doi.org/102217/pgs14119> [Internet]. 2014 Nov 20 [cited 2024 Jan 11];15(13):1643–52. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs.14.119>
43. Hiltunen TP, Donner KM, Sarin AP, Saarela J, Ripatti S, Chapman AB, et al. Pharmacogenomics of Hypertension: A Genome-Wide, Placebo-Controlled Cross-Over Study, Using Four Classes of Antihypertensive Drugs. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* [Internet]. 2015 [cited 2024 Jan 11];4(1). Available from: </pmc/articles/PMC4330076/>
  44. Oliveira-Paula GH, Pereira SC, Tanus-Santos JE, Lacchini R. Pharmacogenomics and hypertension: Current insights. *Pharmgenomics Pers Med*. 2019;12:341–59.
  45. Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, et al. Polymorphisms of  $\alpha$ -adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* [Internet]. 1997 May 10 [cited 2024 Jan 11];349(9062):1353–7. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673697010295/fulltext>
  46. Glorioso N, Filigheddu F, Cusi D, Troffa C, Conti M, Natalizio M, et al.  $\alpha$ -Adducin 460Trp Allele Is Associated With Erythrocyte Na Transport Rate in North Sardinian Primary Hypertensives. *Hypertension* [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2024 Jan 11];39(2 II):357–62. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/hy0202.103065>
  47. Sciarrone MT, Stella P, Barlassina C, Manunta P, Lanzani C, Bianchi G, et al. ACE and  $\alpha$ -Adducin Polymorphism as Markers of Individual Response to Diuretic Therapy. *Hypertension* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2024 Jan 11];41(3 D):398–403. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.HYP.0000057010.27011.2C>
  48. Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinke E. C825T Polymorphism of the G Protein  $\beta$ 3-Subunit and Antihypertensive Response to a Thiazide Diuretic. *Hypertension* [Internet]. 2001 [cited 2024 Jan 11];37(2 II):739–43. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.hyp.37.2.739>
  49. Svensson-Färbom P, Wahlstrand B, Almgren P, Dahlberg J, Fava C, Kjeldsen S, et al. A functional variant of the NEDD4L gene is associated with beneficial treatment response with  $\beta$ -blockers and diuretics in hypertensive patients. *J Hypertens* [Internet]. 2011 [cited 2024 Jan 11];29(2):388–95. Available from: [https://journals.lww.com/jhypertension/fulltext/2011/02000/a\\_functional\\_variant\\_of\\_the\\_nedd4l\\_gene\\_is.30.aspx](https://journals.lww.com/jhypertension/fulltext/2011/02000/a_functional_variant_of_the_nedd4l_gene_is.30.aspx)
  50. McDonough CW, Burbage SE, Duarte JD, Gong Y, Langaee TY, Turner ST, et al. Association of variants in NEDD4L with blood pressure response and adverse cardiovascular outcomes in hypertensive patients treated with thiazide diuretics. *J Hypertens* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jan 11];31(4):698. Available from: </pmc/articles/PMC3756535/>
  51. Suonsyrjä T, Donner K, Hannila-Handelberg T, Fodstad H, Kontula K, Hiltunen TP. Common genetic variation of  $\beta$ 1-and  $\beta$ 2-adrenergic receptor and response to four classes of antihypertensive treatment. *Pharmacogenet Genomics* [Internet]. 2010 [cited 2024 Jan 11];20(5):342–5. Available from: [https://journals.lww.com/jpharmacogenetics/fulltext/2010/05000/common\\_genetic\\_variation\\_of\\_\\_1\\_\\_and\\_\\_2\\_\\_adrenergic.8.aspx](https://journals.lww.com/jpharmacogenetics/fulltext/2010/05000/common_genetic_variation_of__1__and__2__adrenergic.8.aspx)

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

52. Magvanjav O, McDonough CW, Gong Y, McClure LA, Talbert RL, Horenstein RB, et al. Pharmacogenetic associations of  $\beta$ 1-adrenergic receptor polymorphisms with cardiovascular outcomes in the SPS3 trial. *Stroke* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Jan 12];48(5):1337. Available from: [/pmc/articles/PMC5404951/](#)
53. Johnson JA, Zineh I, Puckett BJ, McGorray SP, Yarandi HN, Pauly DF.  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor Polymorphisms and Antihypertensive Response to Metoprolol. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2024 Jan 11];74(1):44–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0009-9236%2803%2900068-7>
54. Singh S, El Rouby N, McDonough CW, Gong Y, Bailey KR, Boerwinkle E, et al. Genomic Association Analysis Reveals Variants Associated With Blood Pressure Response to Beta-Blockers in European Americans. *Clin Transl Sci* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2024 Jan 11];12(5):497. Available from: [/pmc/articles/PMC6742943/](#)
55. Gong Y, Wang Z, Beitelshes AL, McDonough CW, Langaee TY, Hall K, et al. PHARMACOGENOMIC GENOME-WIDE META-ANALYSIS OF BLOOD PRESSURE RESPONSE TO BETA-BLOCKERS IN HYPERTENSIVE AFRICAN AMERICANS. *Hypertension* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2024 Jan 11];67(3):556. Available from: [/pmc/articles/PMC4752391/](#)
56. Singh S, Warren HR, Hiltunen TP, McDonough CW, El Rouby N, Salvi E, et al. Genome-Wide Meta-Analysis of Blood Pressure Response to  $\beta$ 1-Blockers: Results From ICAPS (International Consortium of Antihypertensive Pharmacogenomics Studies). *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* [Internet]. 2019 Aug 8 [cited 2024 Jan 11];8(16). Available from: [/pmc/articles/PMC6759913/](#)
57. Kamide K, Yang J, Matayoshi T, Takiuchi S, Horio T, Yoshii M, et al. Genetic Polymorphisms of L-Type Calcium Channel .ALPHA.1C and .ALPHA.1D Subunit Genes are Associated With Sensitivity to the Antihypertensive Effects of L-Type Dihydropyridine Calcium-Channel Blockers. *Circulation Journal*. 2009;73(4):732–40.
58. Kim S, Cho CH, Geum D, Lee HJ. Association of CACNA1C variants with bipolar disorder in the Korean population. *Psychiatry Investig*. 2016 Jul 1;13(4):453–7.
59. ChromasPro | Technelysium Pty Ltd [Internet]. [cited 2024 Mar 11]. Available from: <https://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>

## Anexo 1 – Consentimento Informado

	<b>IMPRESSO</b> <b>Consentimento livre e informado</b> Código: CHUCB.IMP.INVEST.18	Edição: 3	Revisão: 2
---	--	-----------	------------

Miguel Castelo Branco Craveiro de Sousa,

A realizar um trabalho de investigação subordinado ao tema “Variedade Interindividual na Resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina”, vem solicitar a sua colaboração neste estudo. Informo que a sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento sem que por isso venha a ser prejudicado nos cuidados de saúde prestados pelo CHUCB-EPE, e informo ainda que a sua privacidade será respeitada, todos os dados recolhidos serão confidenciais e não serão fornecidas quaisquer compensações.

**Objetivo do trabalho de investigação:** Estudar a variedade Interindividual na resposta ao tratamento da Hipertensão Arterial a pacientes que usem o anti-hipertensor Amlodipina.

**CrITÉRIOS de inclusão:**

- Indivíduos diagnosticados com hipertensão arterial essencial ligeira a moderada
  - (PAS  $\geq 140$  e  $\leq 180$  mmHg e PAD  $\geq 90$  e  $\leq 110$  mmHg)
- Indivíduos com idade  $\geq 18$  anos
- Indivíduos seguidos em consulta de Medicina Interna no CHUCB
- Indivíduos que estejam a tomar Amlodipina em Monoterapia ou associada a outros fármacos anti-hipertensores

**CrITÉRIOS de exclusão:**

- Indivíduos diagnosticados com hipertensão arterial secundária
- Indivíduos com idade  $< 18$  anos

**Procedimentos necessários:** Utilização de amostras de sangue recolhidas aquando das análises de rotina. Para a recolha das amostras não será necessário realizar procedimentos extra aos já realizados para o tratamento. Os materiais biológicos (sangue) que irão ser utilizados como amostras para este estudo seriam descartados.

**Risco/Benefício da sua participação:** Nenhum, visto que as análises genéticas serão feitas utilizando as amostras obtidas das análises de rotina e/ou do tratamento.


**Duração da participação no estudo:** Não aplicável.

**Nº Aproximado de Participantes:** 10

**Contacto para esclarecimento de dúvidas:** a41000@fcsaude.ubi.pt

Consentimento Informado – Investigador

Ao assinar esta página, o investigador está a confirmar o seguinte:

  
Página: 1 de 2

## Variedade interindividual na resposta a um anti-hipertensor, a Amlodipina

\* Entregou esta informação;

\* Explicou o propósito deste trabalho;

\* Explicou e respondeu a todas as questões e dúvidas apresentadas pelo participante ou representante legal.

Miguel Castelo Branco Craveiro de Sousa

---

Nome do Investigador (Legível)

---

Assinatura do Investigador \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Data

Consentimento Informado – Participante

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- \* O Sr. (a) leu e compreendeu todas as informações desta informação, e teve tempo para as ponderar;
- \* Todas as suas questões foram respondidas satisfatoriamente;
- \* Se não percebeu qualquer das palavras, solicitou ao aluno/investigador uma explicação, tendo este esclarecido todas as dúvidas;
- \* Informa-se ainda:
- \* O Sr. (a) recebeu uma cópia desta informação, para a manter consigo.

Nome do Participante (Legível com número do cartão do cidadão ou bilhete de identidade)

---

(Nome do Participante)

---

(Assinatura do Participante) \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_



## Anexo 2 – Protocolo de extração com o *kit* Promega



### 3. Protocols for Genomic DNA Isolation

We tested the purification of genomic DNA from fresh whole blood collected in EDTA, heparin and citrate anticoagulant tubes and detected no adverse effects upon subsequent manipulations of the DNA, including PCR (2). Anticoagulant blood samples may be stored at 2–8°C for up to two months, but DNA yield will be reduced with increasing length of storage.

The protocol in Section 3.A has been designed and tested for blood samples up to 3ml in volume. The protocol in Section 3.B has been designed and tested for blood samples up to 10ml in volume. The yield of genomic DNA will vary depending on the quantity of white blood cells present. Frozen blood may be used in the following protocols, but yield may be lower than that obtained using fresh blood, and additional Cell Lysis Solution may be required.

**Caution:** When handling blood samples (Sections 3.A, B and C), follow recommended procedures at your institution for biohazardous materials or see reference 3.

#### 3.A. Isolating Genomic DNA from Whole Blood (300µl or 3ml Sample Volume)

##### Materials to Be Supplied by the User

- sterile 1.5ml microcentrifuge tubes (for 300µl blood samples)
- sterile 15ml centrifuge tubes (for 3ml blood samples)
- water bath, 37°C
- isopropanol, room temperature
- 70% ethanol, room temperature
- water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)

1. For 300µl Sample Volume: Add 900µl of Cell Lysis Solution to a sterile 1.5ml microcentrifuge tube.  
For 3ml Sample Volume: Add 9.0ml of Cell Lysis Solution to a sterile 15ml centrifuge tube.

1. **!** **Important:** Blood must be collected in EDTA, heparin or citrate anticoagulant tubes to prevent clotting.
2. Gently rock the tube of blood until thoroughly mixed; then transfer blood to the tube containing the Cell Lysis Solution. Invert the tube 5–6 times to mix.
3. Incubate the mixture for 10 minutes at room temperature (invert 2–3 times once during the incubation) to lyse the red blood cells. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 20 seconds at room temperature for 300µl sample. Centrifuge at 2,000 × *g* for 10 minutes at room temperature for 3ml sample.
4. Remove and discard as much supernatant as possible without disturbing the visible white pellet. Approximately 10–20µl of residual liquid will remain in the 1.5ml tube (300µl sample). Approximately 50–100µl of residual liquid will remain in the 15ml tube (3ml sample).

If blood sample has been frozen, repeat Steps 1–4 until pellet is white. There may be some loss of DNA from frozen samples.

**Note:** Some red blood cells or cell debris may be visible along with the white blood cells. If the pellet appears to contain only red blood cells, add an additional aliquot of Cell Lysis Solution after removing the supernatant above the cell pellet, and then repeat **Steps 3–4**.



5. Vortex the tube vigorously until the white blood cells are resuspended (10–15 seconds).
- ❗ **Completely resuspend the white blood cells to obtain efficient cell lysis.**
6. Add Nuclei Lysis Solution (300µl for 300µl sample volume; 3.0ml for 3ml sample volume) to the tube containing the resuspended cells. Pipet the solution 5–6 times to lyse the white blood cells. The solution should become very viscous. If clumps of cells are visible after mixing, incubate the solution at 37°C until the clumps are disrupted. If the clumps are still visible after 1 hour, add additional Nuclei Lysis Solution (100µl for 300µl sample volume; 1.0ml for 3ml sample volume) and repeat the incubation.
7. **Optional:** Add RNase Solution (1.5µl for 300µl sample volume; 15µl for 3ml sample volume) to the nuclear lysate, and mix the sample by inverting the tube 2–5 times. Incubate the mixture at 37°C for 15 minutes, and then cool to room temperature.
8. Add Protein Precipitation Solution (100µl for 300µl sample volume; 1.0ml for 3ml sample volume) to the nuclear lysate, and vortex vigorously for 10–20 seconds. Small protein clumps may be visible after vortexing. **Note:** If additional Nuclei Lysis Solution was added in **Step 6**, add a total of 130µl Protein Precipitation Solution for 300µl sample volume and 1.3ml Protein Precipitation Solution for 3ml sample volume.
9. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 3 minutes at room temperature for 300µl sample volume. Centrifuge at 2,000 × *g* for 10 minutes at room temperature for 3ml sample volume.  
A dark brown protein pellet should be visible. If no pellet is observed, refer to Section 4.
10. For 300µl sample volume, transfer the supernatant to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 300µl of room-temperature isopropanol. For 3ml sample volume, transfer the supernatant to a 15ml centrifuge tube containing 3ml room-temperature isopropanol.  
**Note:** Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
11. Gently mix the solution by inversion until the white thread-like strands of DNA form a visible mass.
12. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 1 minute at room temperature for 300µl sample. Centrifuge at 2,000 × *g* for 1 minute at room temperature for 3ml sample. The DNA will be visible as a small white pellet.
13. Decant the supernatant, and add one sample volume of room temperature 70% ethanol to the DNA. Gently invert the tube several times to wash the DNA pellet and the sides of the microcentrifuge tube. Centrifuge as in Step 12.
14. Carefully aspirate the ethanol using either a drawn Pasteur pipette or a sequencing pipette tip. The DNA pellet is very loose at this point and care must be used to avoid aspirating the pellet into the pipette. Invert the tube on clean absorbent paper and air-dry the pellet for 10–15 minutes.
15. Add DNA Rehydration Solution (100µl for 300µl sample volume; 250µl for 3ml sample volume) to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
16. Store the DNA at 2–8°C.

## Anexo 3 – Protocolo de Purificação e Envio para a STABVIDA

Grupo Professora Luiza Granadeiro	Sequenciação STABVIDA	Protocolo desenvolvido por Micaela Almeida
--------------------------------------	--------------------------	---

### Purificação de produto de PCR

Após confirmação da amplificação do gene alvo em estudo, por PCR seguido de eletroforese com 5µL de amostra, procedemos à purificação da amostra.

1. Fazer Mix com Fastap + EXOI

		<u>Alicota de trabalho</u>
MIX	0,5µL Fastap	} <b>100µL Fastap</b> <b>50µL EXOI</b>
	0,25µL EXOI	

2. 10µL de produto de PCR + 0,75 µL da mix (Fastap+EXO1)
3. Colocar no termociclador nas seguintes condições:

20' a 37º  
20' a 80º  
1' a 12º

4. O produto está purificado, podemos congelar ou preparar para sequenciação.

### Preparar amostras para sequenciação

1. Na placa ou no eppendorf de 1,5µL colocar como segue:

5 µL de H<sub>2</sub>O  
+  
3µL de Primer (Forward ou Reverse) [1:10]= concentração da alicota de trabalho  
+  
5µL de produto de PCR purificado

2. Fazer pedido online no site da STABVIDA
3. No site da STABVIDA é necessário preencher a tabela com o nome que pretendemos dar a cada amostra
4. Ativar o código das etiquetas segundo a informação da tabela
5. Ao preencher o pedido é muito importante colocar nas notas: "**Utilizar protocolo de detecção de heterozigotos**".
6. Colar as etiquetas na placa ou em cada eppendorf (conforme se aplicar)
7. Agendar a recolha. Nota: Ligar para a STABVIDA com antecedência para saber quem faz a recolha e como deve a empresa ser contactada.
8. Colocar as amostras dentro de um envelope e colocar no frio até recolha:
9. No envelope colocar:

Remetente:	Destinatário: STABVIDA
------------	---------------------------