



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:

Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

**MODELOS DE INVESTIGAÇÃO ETIOPATOLÓGICA DE ANORMALIDADES DO
CALIBRE VASCULAR RETINIANO: INTEGRAÇÃO DE FATORES
EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E MOLECULARES**

TESE DE DOUTORADO

Marina Beltrami Moreira

Orientador: Prof. Dr. Flávio Danni Fuchs

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Costa Fuchs

Porto Alegre, 2012



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:

CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

MODELOS DE INVESTIGAÇÃO ETIOPATOLÓGICA DE ANORMALIDADES DO

CALIBRE VASCULAR RETINIANO: INTEGRAÇÃO DE FATORES

EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E MOLECULARES

Dr^a Marina Beltrami Moreira

Orientador: Prof. Dr. Flávio Danni Fuchs

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Costa Fuchs

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutora-PhD.

Porto Alegre, 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Moreira, Marina Beltrami

Modelos de investigação etiopatológica de anormalidades do calibre vascular retiniano: Integração de fatores epidemiológicos, clínicos e moleculares / Marina Beltrami Moreira. -- 2012. 99 f.

Orientador: Flávio Danni Fuchs.
Coorientadora: Sandra Costa Fuchs.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Cardiologia. 2. Hipertensão. 3. Vasos retinianos. 4. Óxido nítrico sintase. 5. Adiponectina. I. Fuchs, Flávio Danni, orient. II. Fuchs, Sandra Costa, coorient. III. Título.

Ao meu pai, Carlos, por todo o amor, incentivo e ensinamentos que me trouxeram até aqui.

À minha irmã, Rafaela, fonte inesgotável de apoio.

À minha amiga, Jeruza, por tudo o que compartilhamos nessa jornada.

À minha mãe, amiga, colega e Professora, Leila, por todo amor, incentivo, ensinamentos, apoio e tudo o que compartilhamos nesse caminho.

Agradecimentos

Devo imensa gratidão à minha família, por todo o investimento que em mim fizeram desde sempre. Obrigada por apoiarem minhas escolhas. Sem o estímulo, amor e confiança de vocês eu não estaria aqui, e não seria quem sou.

Agradeço às amigas e aos amigos por todas as alegrias compartilhadas e apoio recebido nas horas de necessidade. Em especial agradeço a Jeruza, companheira indissociável em toda a jornada na Faculdade de Medicina e na pós-graduação, e a João Francisco, pelo apoio incondicional que sempre encontrei. Meu mundo teria menos cores sem vocês.

Meus agradecimentos aos Professores Dr. Flávio Fuchs e Dr^a. Sandra Fuchs, que desde muito cedo me acolheram. Deram-me oportunidades de aprendizado e de crescimento, confiaram em meu trabalho e me conduziram até este momento. São modelos de pesquisadores, comprometidos com a ciência, com a ética e com as pessoas, sejam alunos, pacientes ou sociedade.

Muito obrigada a todos os Professores da Faculdade de Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Cardiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul que em algum momento foram fonte de saber e inspiração. Gostaria de agradecer especialmente ao Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro, *in memoriam*, pela confiança em mim depositada e pelas portas que para mim abriu.

Sumário

Siglas e abreviaturas em português.....	vi
Siglas e abreviaturas em inglês.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	3
2.1 Hipertensão e microcirculação.....	3
2.1.1 Hipertensão arterial: relevância como fator de risco cardiovascular	3
2.1.2 Retina e Hipertensão: associações clínicas e epidemiológicas.....	5
2.1.3 Análise semiautomática do calibre vascular retiniano.....	10
2.1.4 Remodelamento de artérias de resistência: primeiro dano em órgão-alvo na hipertensão?	13
2.2 Investigação de mecanismos fisiopatológicos com base na observação da microcirculação da retina.....	16
2.2.1 Importância dos fatores genéticos na determinação do calibre vascular retiniano.....	16

2.2.2	Óxido nítrico e óxido nítrico sintase endotelial.....	19
2.2.3	Adiponectina: nova interação entre sistemas endócrino e cardiovascular.....	24
2.2.4	Adiponectina e remodelamento vascular.....	33
3.	Justificativa.....	36
4.	Referências.....	37
5.	Objetivos	53
5.1	Objetivos Gerais.....	53
5.2	Objetivos específicos.....	53
6.	Artigo 1.....	55
7.	Artigo 2.....	76
8.	Conclusões.....	97
9.	Considerações finais.....	98

Siglas e abreviaturas em português

DNTs – Doenças não transmissíveis

DCV – Doença cardiovascular

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

RAV – Razão arteríolo-venular

DM – Diabetes mellitus

APN – Adiponectina

RR – Razão de Risco

IC – Intervalo de confiança

SCA – Síndrome coronariana aguda

iECA – Inibidores da enzima conversora de angiotensina

DAC – Doença arterial coronariana

ICC – Insuficiência cardíaca congestiva

Siglas e abreviaturas em inglês

CSA – Cross sectional area

CRAE – Central retina arteriolar equivalent

CRVE – Central retina venular equivalent

SNP – Single nucleotide polymorphism

NOS – Nitric oxide synthase

HR – Hazard ratio

OR – Odds Ratio

AMPK – AMP-activated protein kinase

MMP – Matrix metalloproteinase

PDGF-BB – Platelet-derived growth factor-BB

ELISA – Enzyme linked immunossorbent assay

Lista de Tabelas e Figuras

Revisão da Literatura

Tabela 1: Comparação entre características morfológicas de pequenas artérias subcutâneas e arteríolas retinianas.....	9
Figura 1: Retinal Assessment System – aferição do calibre vascular por método microdensitométrico.....	12
Tabela 2: Genes candidatos identificados em estudo de ligação pan-genômico.....	18
Tabela 3: Distribuição genotípica em amostras de indivíduos brasileiros.....	23
Tabela 4: Fatores associados à variação de adiponectina plasmática.....	29

Artigo 1: NOS3 G894T polymorphism and retinal vessel caliber in hypertension

Tabela 1: Sample characteristics according to NOS3 genotype.....	72
Tabela 2: Characteristics associated with retinal vessel calibers.....	73
Tabela 3: Correlation between retinal vessel caliber and studied variables.....	74
Tabela 4: Multiple linear regression model of retinal vessels determinants in hypertensive patients.....	75

Artigo 2: Association between plasma adiponectin and retinal vessels caliber among hypertensive individuals: evidence for interaction with age.

Tabela 1: Sample characteristics according to median of plasma adiponectin concentration.....	92
Tabela 2: Characteristics associated with retinal vessel caliber.....	94
Tabela 3: Multiple linear regression model of retinal vessels determinants in hypertensive individuals according to age.....	96

Resumo

Introdução: Hipertensão arterial sistêmica é um dos principais fatores de risco para doença cardiovascular, que hoje constitui a principal causa de morbimortalidade no Brasil. Além das doenças macrovasculares, a hipertensão também está implicada na etiopatogenia de doenças microvasculares, a retinopatia hipertensiva. Alteração no calibre dos vasos da retina ocorre precocemente. Redução do calibre arteriolar e aumento do calibre venular associaram-se diretamente com incidência de doenças cardiovasculares e mortalidade por qualquer causa em grandes estudos de coorte. Estreitamento arteriolar é capaz de prever incidência de hipertensão. Além do valor prognóstico, a visualização dos vasos da retina permite o estudo de alterações que podem ser atribuíveis, ao menos em parte, ao remodelamento microvascular sistêmico que ocorre em hipertensos, oportunizando estudá-las *in vivo* em seres humanos.

O óxido nítrico é uma das principais substâncias vasoativas na retina, em parte, produzido através da enzima óxido nítrico sintase endotelial, codificada pelo gene NOS3. Polimorfismos nesse gene, especialmente o polimorfismo de único nucleotídeo G894T (Glu298Asp), associaram-se a aumento de risco de hipertensão e doença coronariana em algumas populações. Fatores genéticos têm grande importância na determinação do calibre vascular retiniano, mas o polimorfismo G894T do gene NOS3 nunca foi investigado como candidato.

Adiponectina é um hormônio que aumenta a sensibilidade insulínica em diversos tecidos, melhorando perfil lipídico e glicídico, sendo associada a menor risco de diabetes mellitus e doença aterosclerótica na população geral.

Entre indivíduos com doença cardiovascular estabelecida e em idosos, no entanto, aumento de adiponectina plasmática associa-se a maior mortalidade. Estudos em indivíduos hipertensos sugerem que adiponectina é protetora contra arterioesclerose de grandes vasos e contra retinopatia hipertensiva avaliada por oftalmoscopia. A associação entre adiponectina e calibre vascular da retina, no entanto, ainda não foi investigada.

Objetivos: O objetivo geral foi analisar a etiopatogenia das alterações microvasculares aferidas por calibre vascular retiniano, compostos por fatores de risco cardiovascular advindos da base epidemiológica e elementos moleculares oriundos de modelos experimentais. Para tal, desenvolveram-se modelos integrados de etiopatogenia das alterações microvasculares retinianas. Os objetivos específicos foram estudar, através dos modelos propostos, a associação entre o polimorfismo G894T do gene NOS3 e calibre vascular retiniano e a relação entre adiponectina plasmática e calibre dos vasos da retina.

Métodos: Indivíduos de 18 a 80 anos encaminhados ao Ambulatório de Hipertensão, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, foram avaliados. Dados de monitorização ambulatorial da pressão arterial de 24 horas e medidas de consultório, informações sociodemográficas, história médica pregressa, medicamentos em uso e amostra de sangue para exames complementares e genótipo foram coletados. O calibre vascular foi aferido em retinografias digitalizadas, por método microdensitométrico. Genotipagem foi realizada com sistema TaqMan, e adiponectina total foi mensurada por ELISA.

Resultados: Para estudo do polimorfismo G894T, 175 indivíduos foram incluídos. Comparando-se os grupos GG vs. TT/TG, a média do calibre arteriolar foi $107,1 \pm 10,5 \mu\text{m}$ (n=85) vs. $106,8 \pm 9,4 \mu\text{m}$ (n=84; P=0,98), e a média do calibre venular foi $129,2 \pm 13,8$ (n=89) vs. $129,6 \pm 14,9$ (n=84; P=0,95). Preditores independentes de calibre arteriolar foram HbA1c ($\beta=-0,224$; P=0,004), colesterol total ($\beta=-0,195$; P=0,014) e *fellow vessel*. Índice de massa corporal ($\beta=0,181$; P=0,02), tabagismo ($\beta=0,170$; P=0,03), e *fellow vessel* foram preditores independentes do calibre venular. Nenhuma associação foi encontrada com o genótipo TT/TG.

Para investigação de adiponectina, 172 indivíduos foram incluídos. Indivíduos com adiponectina abaixo da mediana apresentaram maior circunferência da cintura ($102,0 \pm 10,0$ vs. $98,6 \pm 11,8$ cm; P=0,04), HbA1c ($6,8 \pm 1,4$ vs. $6,4 \pm 0,8\%$, P=0,008), e prevalência de diabetes (50,0 vs. 33,7%, P=0,03), e menor HDL ($45,7 \pm 10,9$ vs. $50,7 \pm 14,0$ mg/dl, P=0,01). Calibre arteriolar associou-se diretamente com idade ($\beta=0,183$; P=0,03) e inversamente com HbA1c ($\beta=-0,211$; P=0,01). Calibre venular foi maior entre homens do que mulheres ($132,3 \pm 17,9$ vs. $127,2 \pm 11,4$; P=0,04). Na análise multivariada, adiponectina ($\beta=-0,410$; P<0,001) e HbA1c ($\beta=-0,362$; P=0,001) associaram-se inversamente com calibre arteriolar em indivíduos mais velhos. Entre os mais jovens, não houve associações significativas. Não foram identificados preditores independentes de calibre venular.

Conclusões: Polimorfismo G894T do gene NOS3 não está associado com o calibre dos vasos da retina entre indivíduos hipertensos. A associação inversa entre calibre arteriolar e adiponectinemia sugere que essa seja marcadora de dano vascular e de mau prognóstico cardiovascular. Essa associação, no

entanto, restringe-se aos indivíduos com 60 a 80 anos.

Abstract

Background: Hypertension is a major cardiovascular risk factor, and one of the leading causes of morbidity and mortality in Brazil. Hypertension is associated with macrovascular as well as microvascular disease, including hypertensive retinopathy. Changes in retinal vascular caliber occur early in the clinical course of the disease. Narrower arterioles and wider venules are predictors of cardiovascular disease (CVD) and death in cohort studies. Arteriolar narrowing can also predict incidence of hypertension. Besides their prognostic significance, retinal vascular calibers allows direct *in vivo* visualization of pathological processes that may be at least partially attributable to the systemic arteriolar remodeling found in hypertensive subjects.

Nitric oxide is a major vasoactive substance in the retina, and is mostly synthesized by endothelial nitric oxide synthase, coded by the NOS3 gene. Polymorphisms in NOS3, specially the single nucleotide polymorphism (SNP) G894T (Glu298Asp), have been related to increased risk of hypertension and coronary disease in some populations. Genetic factors are major determinants of retinal vascular caliber, but the SNP G894T has not been investigated to date.

Adiponectin increases insulin sensitivity in many tissues, improving the carbohydrate and lipid metabolisms. It was associated with lower prevalence of diabetes mellitus and atherosclerotic disease in the general population. Among individuals with established CVD and also in older subjects, adiponectin has been associated with increased mortality. Regarding individuals with hypertension, it was demonstrated that adiponectin is associated with reduction

in arteriosclerosis and hypertensive retinopathy severity, assessed through ophthalmoscopy. The relationship between adiponectin and retinal vessel caliber has not been investigated.

Objectives: We aimed to assess retinal microvascular findings in hypertension, assessed through retinal vascular caliber. We aimed to developing an integrative etiopathological model for retinal microvascular abnormalities. This model would include risk factors identified in epidemiologic studies and molecular factors based on physiopathological investigations. The specific goals were to investigate the association of the G894T SNP of NOS3 gene and retinal vascular caliber and the relationship of plasma adiponectin and vessel calibers through these models.

Methods: Subjects 18 to 80 years old referred to the Hypertension Outpatient Clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre were evaluated. Ambulatory Blood Pressure (ABP) monitoring and office blood pressure, socio-demographic characteristics, past medical history, and pharmacological treatment, as well as blood samples, were collected. Retinal vessel measurement was performed through microdensitometric analysis of retinographies. TaqMan system was used for genotyping and ELISA for total plasma adiponectin quantification.

Results: One hundred seventy five subjects were included in the NOS3 study. Comparing GG vs. TT/TG groups, mean arteriolar caliber was $107.1 \pm 10.5 \mu\text{m}$ (n=85) vs. $106.8 \pm 9.4 \mu\text{m}$ (n=84; P=0.98); mean venular caliber was 129.2 ± 13.8 (n=89) vs. 129.6 ± 14.9 (n=84; P=0.95), respectively. HbA1c ($\beta=-0.224$; P=0.004), total cholesterol ($\beta=-0.195$; P=0.014), and fellow vessel were independent predictors of arteriolar caliber. Body mass index ($\beta=0.181$;

P=0.02), smoking ($\beta=0.170$; P=0.03), and fellow vessel were independent predictors of venular caliber. No association was found with TT/TG genotype.

One hundred and seventy two individuals were included in the adiponectin study. Subjects under adiponectin median had larger waist circumference (102.0 ± 10.0 vs. 98.6 ± 11.8 cm; P=0.04), higher HbA1c (6.8 ± 1.4 vs. $6.4 \pm 0.8\%$, P=0.008) and diabetes mellitus prevalence (50.0 vs. 33.7%, P=0.03), and lower HDL cholesterol (45.7 ± 10.9 vs. 50.7 ± 14.0 mg/dl, P=0.01). Arteriolar caliber was directly correlated with age ($\beta=0.183$; P=0.03) and inversely with HbA1c ($\beta=-0.211$; P=0.01). Venules were wider among men than women (132.3 ± 17.9 vs. 127.2 ± 11.4 ; P=0.04). In multivariate analysis, adiponectin ($\beta = -0.410$; P<0.001) and HbA1c ($\beta = -0.362$; P=0.001) were independently associated with arteriolar caliber among individuals 60 to 80 years old, adjusted for fellow vessel. Among subjects 27 to 59 years old, no independent predictors were identified. We found no independent predictor of venular caliber besides the fellow vessel.

Conclusions: G894T SNP of NOS3 gene is not associated with retinal vessel caliber among patients with hypertension. The inverse association between adiponectin and arteriolar caliber suggests that it is a marker of vascular damage, and may indicate poor cardiovascular prognosis. This relationship is restricted to subjects 60 to 80 years old.

1. Introdução

Doenças não transmissíveis, como hipertensão arterial e suas complicações cardiovasculares, possuem origem multifatorial complexa (1). Incidem e evoluem clinicamente de acordo com fatores genéticos e epigenéticos, interagindo com exposições ambientais desde a gestação até a vida adulta através de diferentes vias (2). Investigações fisiopatológicas, muitas vezes, não capturam essa interação. Mesmo biologia de sistemas e medicina de redes, apesar de abordarem interações complexas, pouco têm a oferecer a respeito da interação do organismo e suas partes com fatores de risco ambientais e comportamentais, frequentemente identificados em estudos epidemiológicos.

A proposta central dessa tese é apresentar um exemplo dessa integração na investigação exploratória de mecanismos fisiopatológicos. Para isso, o estudo das alterações microvasculares foi realizado através de retinografias de indivíduos hipertensos. A verificação de possíveis associações entre elementos moleculares e calibre dos vasos da retina foi realizada à luz de informações clínicas e sociodemográficas desses indivíduos.

Essa integração foi obtida com o emprego de método de análise estatística desenvolvida em estudos epidemiológicos (3). Após o desenvolvimento de um quadro conceitual e a construção de um modelo teórico hierarquizado de potenciais determinantes do calibre vascular retiniano, avaliamos as associações de calibre dos vasos retinianos com polimorfismo do gene NOS3, codificador da enzima óxido nítrico sintase endotelial, e adiponectina plasmática.

Essa integração amplia a base do conhecimento sobre como biomarcadores e marcadores moleculares podem interagir com características sociodemográficas e clínicas. Possibilita também a interpretação da relevância da associação desses marcadores com o desfecho clínico em relação aos fatores de risco clássicos, o que pode contribuir para a avaliação da utilidade clínica de biomarcadores. Além disso, esse tipo de análise pode colaborar para a definição de futuras linhas de investigação fisiopatológica, a serem desenvolvidas em modelos experimentais. Essa abordagem constitui uma forma de pesquisa translacional, apesar do fluxo de informações ocorrer no sentido contrário ao mais frequentemente encontrado: da epidemiologia para o laboratório.

2. Revisão da literatura

2.1 – Hipertensão e microcirculação

2.1.1 – Hipertensão arterial: relevância como fator de risco cardiovascular

Doenças não transmissíveis (DNTs), em especial doença cardiovascular (DCV), diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas, são as principais causas de morte e morbidade na maior parte dos países (4). No Brasil, estatísticas sugerem que 72% dos óbitos ocorridos em 2007 decorreram de DNTs (5). Entre as DNTs, a doença cardiovascular tem destaque, sendo a principal causa de óbito entre brasileiros. Apesar do declínio nas taxas desde 1996, em 2004, as DCV foram responsáveis por 286 óbitos por 100.000 habitantes, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (6). Elevação da pressão arterial associa-se com a incidência de acidente vascular encefálico hemorrágico e isquêmico e doença arterial coronariana, e os níveis de pressão arterial associam-se direta e continuamente – desde níveis tão baixos quanto 115/75 mmHg – com incremento do risco para essas condições (7). Estima-se que 13% de todos os óbitos ocorridos no mundo, em 2004, sejam atribuíveis à elevação da pressão arterial, definida como pressão sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão diastólica ≥ 90 mmHg, ou pelo uso de fármacos anti-hipertensivos na presença de valores inferiores a esses (6).

Parte da importância da elevação da pressão arterial como fator de risco cardiovascular é atribuível à sua prevalência. Em 2008, a prevalência de hipertensão (HAS) autorreferida entre brasileiros era de 24,0% (IC 95% 23,7–24,4) entre mulheres e de 17,3% (17,0–17,6) entre homens com idade ≥ 20 anos (8). Em estudo de amostra representativa da população urbana de Porto Alegre, a incidência de hipertensão arterial foi estimada em 39 casos por 1000 pessoas-ano; entre indivíduos pré-hipertensos (PA sistólica 130-139 mmHg ou diastólica 85-89 mmHg) a incidência foi cerca de 80% em 10 anos (9).

Além da relação com eventos macrovasculares, elevação da pressão arterial associa-se a dano microvascular, levando principalmente à doença renal crônica e à retinopatia hipertensiva. Hipertensão é o segundo diagnóstico primário mais frequente entre indivíduos com insuficiência renal crônica terminal, tanto prevalente quanto incidente, de acordo com estatísticas americanas (10). Em relação ao acometimento oftalmológico, durante 15 anos de seguimento da coorte de Beaver Dam, aproximadamente 14% dos indivíduos não diabéticos desenvolveram sinais de retinopatia – hemorragia retiniana, microaneurismas, exudatos duros e algodonosos, anormalidades vasculares intrarretinianas, neovasos sobre o disco óptico ou qualquer ponto da retina e hemorragia vítrea. Pressão arterial sistólica associou-se significativa e positivamente com o desenvolvimento de retinopatia, e indivíduos com HAS não controlada apresentaram *hazard ratio* (HR) de 2,07 (IC 95% 1,51-2,83) quando comparados aos indivíduos sem diagnóstico de HAS (11). A significância clínico-epidemiológica das anormalidades microvasculares da retina, extensivamente estudada, é revisada a seguir.

2.1.2 – Retina e Hipertensão: associações clínicas e epidemiológicas

As repercussões microvasculares da elevação da pressão arterial, aguda ou crônica, podem ser percebidas ao exame de fundo de olho. Como exemplo de alterações agudas, pré-eclampsia (que frequentemente inclui queixas visuais) pode apresentar-se com alterações como estreitamento arteriolar difuso, isquemia coroidal (12) ou descolamento de neuroretina (13). Os sinais da retinopatia hipertensiva decorrente de HAS sustentada incluem estreitamento arteriolar difuso, com subsequente alteração da razão arteríola-vênula (menor do que 1:3), arteríolas em fio de cobre e entrecruzamentos patológicos (refletindo alterações na parede dos vasos), hemorragias, exudatos duros (extravasamento de plasma com decorrente acúmulo de lipoproteínas, por incompetência endotelial) e exudatos algodinosos (isquemia retiniana).

Observações sobre a relação prognóstica entre alterações do fundo de olho e hipertensão arterial foram registradas por Keith, Wegener e Barker em 1939 (14). A classificação proposta a partir do trabalho de Keith-Wegener-Barker divide a retinopatia hipertensiva em quatro estágios de acordo com a presença e gravidade dos sinais anteriormente descritos. As atuais classes I e II foram derivadas do estudo original, que não as detalhava dessa forma. Essa classificação, determinada por fundoscopia direta ou indireta, associa-se com risco de acidente vascular cerebral entre indivíduos hipertensos (15). No entanto, quando avaliadas por fundoscopia direta, não se associa linearmente com gravidade de hipertensão (16), e significativa variabilidade interobservador limita a utilidade dessa classificação na estratificação de risco de pacientes hipertensos (15).

Estudos epidemiológicos empregando métodos com alta reprodutibilidade na avaliação do fundo de olho apresentaram resultados consonantes com a observação inicial de Keith e colaboradores. Revisão sistemática com metanálise de dados individuais de 20.798 participantes não diabéticos incluiu estudos de base populacional que realizaram medidas automatizadas do calibre dos vasos da retina e que verificaram ocorrência de acidente vascular cerebral no seguimento. Após ajuste do modelo para idade, pressão sistólica, colesterol total, colesterol HDL, tabagismo, uso de anti-hipertensivos, doença coronariana prevalente e *fellow vessel* (vênula anatomicamente pareada à arteríola e vice-versa), o incremento de 20 µm no calibre venular associou-se a um HR=1,15 (1,05-1,25) para incidência de acidente vascular cerebral, enquanto calibre arteriolar não se associou de forma independente. A associação entre calibre venular e acidente vascular cerebral apresentou maior magnitude entre indivíduos com menos de 60 anos de idade [HR=1,36 (1,07-1,73)] e indivíduos sem hipertensão arterial [HR=1,23 (1,05-1,45)] (17).

Considerando doença arterial coronariana fatal e não fatal, foi realizada metanálise dos dados de 22.159 indivíduos participantes de estudos que preenchem os mesmos critérios de inclusão citados anteriormente. Entre mulheres, o incremento de 20 µm no calibre venular apresentou HR=1,16 (1,06-1,26), enquanto a redução de 20 µm no calibre arteriolar acarretou um HR de 1,17 (1,07-1,28), ajustados para idade, pressão sistólica, pressão diastólica, diabetes mellitus, índice de massa corporal (IMC), colesterol total, colesterol HDL, tabagismo, uso de fármacos anti-hipertensivos e *fellow vessel*. Entre homens, ajustando o modelo para os mesmos fatores confundidores, o calibre dos vasos da retina não se associou significativamente ao desfecho (18).

Calibres de vênulas e arteríolas apresentam padrão diferente de associação com desfechos cardiovasculares. Essas divergências foram atribuídas às particularidades dos processos fisiopatológicos predominantes em cada uma das doenças vasculares estudadas. Alterações do calibre venular podem estar associadas à congestão vascular (19), refletindo, por exemplo, disfunção de ventrículo esquerdo, embora não haja evidências suficientes no momento sobre essa associação. Ainda, em estudos populacionais, aumento do calibre venular associou-se a outros desfechos substitutos de aterosclerose de grandes vasos, como escore de placa carotídea e índice tornozelo-braquial, e com medidas de inflamação e marcadores metabólicos, como redução do colesterol HDL e aumento da circunferência da cintura (19, 20). No momento não há explicações fisiopatológicas satisfatórias para o entendimento dessas associações, já que pouco se estuda a respeito das respostas adaptativas de veias de pequeno calibre nas doenças cardiovasculares. Outra particularidade ocorre na doença arterial coronariana, que entre mulheres usualmente apresenta componente de disfunção microvascular mais significativo do que em homens (21). Estudos de pequenas artérias subcutâneas mostram correlação entre remodelamento dessas e redução da reserva de fluxo miocárdico (22). Em resumo, apesar de não serem preditores de desfecho independentes dos demais fatores de risco clássicos, os calibres arteriolar e venular, aferidos por métodos mais precisos do que a fundoscopia, guardam relações prognósticas com eventos macrovasculares na população geral não diabética.

Adicionalmente, modificações no calibre vascular retiniano parecem ocorrer precocemente no curso das alterações cardiometabólicas que culminam em risco cardiovascular aumentado. Em uma coorte australiana (23), calibre arteriolar associou-se inversamente com risco de diabetes mellitus, mesmo após ajuste para

fatores de confusão. Nenhuma associação foi evidenciada com calibre venular. Achados semelhantes foram identificados em outra grande coorte (24). Na coorte de Beaver Dam, observou-se que, a cada decréscimo de um desvio padrão na razão arteríolo-venular (RAV), houve aumento de aproximadamente 30% na incidência de HAS (25). Revisão sistemática com metanálise de estudos prospectivos mostrou que indivíduos com 45 a 97 anos no tercil, quartil ou quintil inferior do calibre arteriolar, quando comparados com o extremo superior, apresentaram chance quase duas vezes maior (OR=1,91 (1,56 – 2,34) de desenvolver HAS durante acompanhamento, o qual variou de 3,2 a 6,6 anos (26).

A observação de que alterações microvasculares podem preceder o diagnóstico clínico de hipertensão é condizente com observações em tecido subcutâneo de seres humanos e em modelos experimentais. Park e Schiffrin (27) demonstraram que 97% dos pacientes hipertensos, sem evidência clínica de lesão em órgão-alvo e sem tratamento farmacológico por pelo menos seis meses, submetidos à biópsia de tecido subcutâneo, apresentavam razão entre espessura da túnica média vascular e diâmetro luminal (razão camada média-lúmen) maior do que a média + 1 DP da razão média-lúmen da amostra, versus 10% dos indivíduos controles. Resposta alterada à acetilcolina, definida pelo mesmo ponto de corte, foi identificada em 58% dos hipertensos versus 20% dos controles. Esses dados apontam a precocidade e importância do remodelamento arterial, mesmo em relação à disfunção endotelial. Em camundongos espontaneamente hipertensos, alterações estruturais nos vasos de resistência são observadas precocemente (28), e ocorrem de forma semelhante em diversos tecidos, como no subcutâneo, renal, miocárdico e cerebral (29).

Apenas recentemente, no entanto, realizou-se comparação direta entre a estrutura de arteríolas retinianas com vasos obtidos por biópsia de tecido subcutâneo em seres humanos (30). Nessa investigação, o diâmetro luminal e espessura da parede arteriolar da retina foram medidos através de fluxometria por laser-Doppler, e as medidas correspondentes dos vasos subcutâneos, através de micromiografia. Entre 40 indivíduos incluídos no estudo, 24 eram hipertensos e 22 eram mulheres, com média de idade de $58,3 \pm 14$ anos. Os achados morfológicos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre características morfológicas de pequenas artérias subcutâneas e arteríolas retinianas

	Normotensos	Hipertensos
<i>Pequenas artérias subcutâneas</i>		
Diâmetro interno (μm)	271 ± 46	$240 \pm 67,3^*$
Espessura da camada média (μm)	$21,7 \pm 4,2$	$20,6 \pm 7,4$
Espessura da adventícia (μm)	$20,2 \pm 4,5$	$20,3 \pm 3,7$
Espessura da parede (μm)	$43,5 \pm 8,6$	$42,4 \pm 7,3$
Área seccional da média (μm^2)	20921 ± 7281	19588 ± 11929
Área seccional da parede (μm^2)	44487 ± 16068	38528 ± 13798
Razão média-lúmen	0.0809 ± 0.008	$0.0914 \pm 0.012^{***}$
<i>Arteríolas retinianas</i>		
Diâmetro externo (μm)	$93,6 \pm 18,9$	$81,7 \pm 19,5^*$
Diâmetro interno (μm)	$74,4 \pm 15,6$	$59,6 \pm 13,4^{**}$
Espessura da parede (μm)	$9,6 \pm 3,9$	11 ± 4
Área seccional da parede (μm^2)	2622 ± 1447	2525 ± 1528
Razão parede-lúmen	$0,264 \pm 0,11$	$0,37 \pm 0,09^{**}$

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Adaptado da referência 30.

Esses dados sugerem que arteríolas retinianas em indivíduos hipertensos são submetidas a um processo de remodelamento semelhante aos demais leitos microvasculares. Nesse estudo (30), observou-se redução da luz e do diâmetro arteriolar, aumento da razão parede-lúmen (de maneira análoga ao aumento da razão média-lúmen) e sem alteração da área seccional da parede, caracterizando remodelamento eutrófico, discutido de maneira pormenorizada adiante. Pode-se considerar, então, que a microcirculação está acessível à visualização direta, *in vivo* e de forma não invasiva, através da observação dos vasos da retina.

2.1.3 – Análise semiautomática do calibre vascular retiniano

Os métodos de aferição do calibre vascular através de análise de fotografias coloridas do fundo de olho introduziram medidas quantitativas, seguras, não invasivas, com boa reprodutibilidade (31), que puderam ser empregadas em estudos epidemiológicos de base populacional com grande número de participantes (32 - 34). Essa ferramenta tornou possível o estudo das associações já apresentadas.

O método microdensitométrico foi desenvolvido para análise de fotografias digitalizadas do fundo óptico. Após aquisição e digitalização da imagem, a primeira etapa, operador-dependente, é a definição das bordas do disco óptico. Após, o *software* desenvolvido por nosso grupo define duas zonas, a interna (0,5 a 1 diâmetro de disco óptico a partir da borda) e a externa (1 a 2 diâmetros) a partir da margem do disco óptico. A segunda etapa, operador-dependente, é a identificação de pares de arteríolas e vênulas, numerando-os. Até doze pares de vasos são

identificados por zona. Em seguida, o avaliador seleciona o seguimento do vaso a ser analisado. Um exemplo da tela de trabalho é apresentado na figura 1. O programa emprega o contraste de cor dos pixels da imagem para definir de forma automatizada a borda do vaso e derivar a distância entre pontos perpendiculares em relação ao eixo do vaso, calculando o calibre médio do seguimento em questão. Esse método apresentou ótima reprodutibilidade para detecção de estreitamento arteriolar difuso, definido como razão arteríolo-venular $<0,67$, tendo o método micrométrico como referência. Os coeficientes Kappa intraobservador e interobservador para zona interna da retinografia foram 0,94 e 0,88, respectivamente. Para zona externa, os valores foram 0,93 e 0,85 (35).

Métodos semelhantes foram empregados nas análises feitas em grandes estudos epidemiológicos. Não obstante, a definição anatômica do que é de fato medido com essas técnicas ocorreu apenas posteriormente. Em estudo conduzido por Pakter e demais colaboradores do nosso grupo (36), medidas obtidas por análise de retinografias foram comparadas aos resultados da angiografia com fluoresceína. Esse exame é considerado o padrão-ouro para estudo da vascularização da retina e coróide, e sabe-se que através dele podemos medir a coluna de sangue, que inclui o fluxo central de hemácias e a porção periférica de plasma. No entanto, a complexidade, riscos e custos associados ao exame inviabilizam a utilização do mesmo em grandes estudos. A comparação entre medidas da retinografia e angiografia fluoresceínica sugerem que a primeira técnica, a exemplo da segunda, é capaz de medir a coluna de sangue nos vasos da retina, não incluindo a parede vascular.

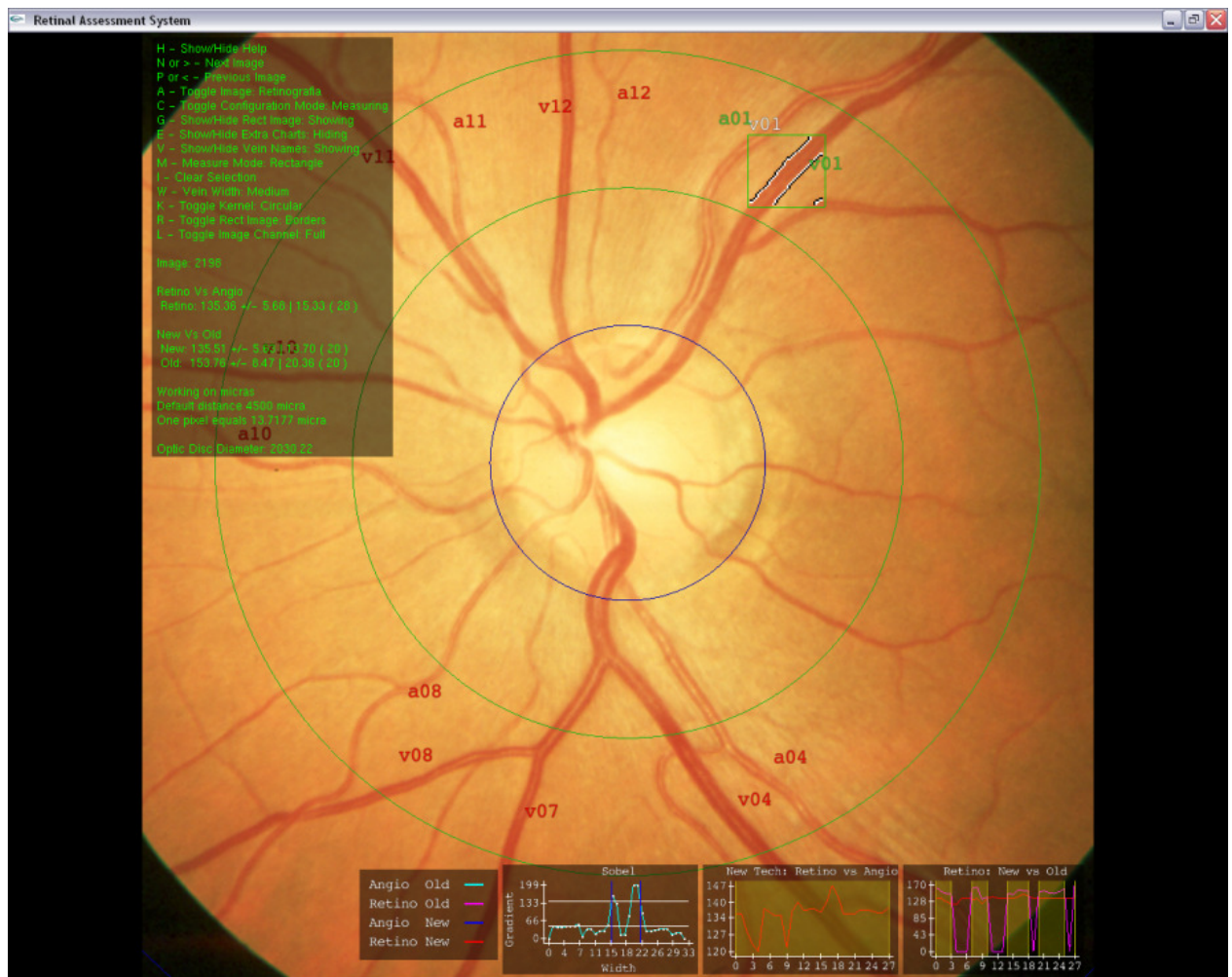


Figura 1: Retinal Assessment System – aferição do calibre vascular por método microdensitométrico

Portanto, a análise do calibre dos vasos retinianos pelo método microdensitométrico oferece uma visão parcial do remodelamento vascular. Através dele, não há informações diretas sobre a parede do vaso, especialmente a camada média. A redução do lúmen vascular, componente fundamental do remodelamento arterial estrutural observado em indivíduos hipertensos, pode ser avaliada pelo diâmetro da coluna de sangue captada na retinografia, embora a influência de variações funcionais não possam ser excluídas. Essa informação é relevante e tem utilidade na predição de eventos, como já apresentado. Dessa forma, análise do calibre vascular pode ser útil na exploração de novos marcadores moleculares potencialmente

envolvidos na fisiopatologia da hipertensão e nos mecanismos que levam a dano aos órgãos-alvo.

2.1.4 – Remodelamento de artérias de resistência: primeiro dano em órgão-alvo na hipertensão?

Artérias de resistência são vasos com 300 a 15 μm de diâmetro, de grande relevância no controle fisiológico da pressão arterial. Pequenas mudanças de calibre nesses vasos são capazes de gerar alterações significativas no regime pressórico. De acordo com a lei de Poiseuille, a resistência vascular relaciona-se inversamente com a quarta potência do raio luminal (37). O aumento da resistência periférica é um marco da hipertensão arterial sistêmica, e, em 1990, Folkow foi o primeiro pesquisador a publicar dados que sustentariam a hipótese de que alterações estruturais dos vasos de resistência seriam fundamentais nesse processo, sobrepondo-se à importância do controle do tônus vascular e de mecanismos vasomotores na elevação sustentada da pressão arterial (38).

Remodelamento arterial é um processo importante em patologias do sistema cardiovascular, como na aterosclerose (39), e pode assumir diversos padrões dependendo da doença e do leito vascular em questão. O lúmen vascular pode estar alterado, com estreitamento ou aumento de diâmetro, ou ainda com remodelamento “compensado”, em que a luz do vaso não se altera significativamente. A parede do vaso também pode sofrer modificações, com hipotrofia ou hipertrofia, ou pode não apresentar alteração da massa da parede vascular (eutrofia). Esse último é

geralmente indicado pela manutenção da área da camada média em um corte histológico transversal (*media cross-sectional area*, CSA) e por um índice de remodelamento (quanto da modificação na forma do vaso pode ser explicada pelo rearranjo de matriz e células, sem aumento de massa) próximo a 100%.

Na HAS essencial, o estreitamento luminal com remodelamento eutrófico da parede vascular é o mais comumente encontrado. Estudo em seres humanos (40) analisou artérias de pequeno calibre dissecadas a partir de biópsia do tecido subcutâneo através de micromiografia, e incluiu indivíduos com hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 (DM), indivíduos com ambas as condições (HAS+DM) e um grupo controle de normotensos não diabéticos. Os autores demonstraram que nos três grupos, quando comparados aos controles sem hipertensão e diabetes, houve aumento da razão M/L, com diminuição do lúmen vascular – mais pronunciada nos grupos HAS e HAS+DM. No grupo HAS, a área da camada média em corte transversal (CSA), no entanto, era similar à dos controles, enquanto estava aumentada nos com DM e limítrofe no grupo HAS+DM. O índice de remodelamento foi de 92% no grupo HAS, 86% no grupo HAS+DM e 75% no grupo DM. Esses dados sugerem que redução do calibre vascular é encontrada tanto em indivíduos hipertensos quanto diabéticos, mas o remodelamento é eutrófico no primeiro caso e hipertrófico no segundo, enquanto o grupo HAS+DM apresentou valores intermediários.

O remodelamento eutrófico é uma resposta adaptativa que pode ser interpretado à luz da equação de Laplace, a qual relaciona estresse intramural (σ), pressão transmural (P), raio do vaso (r) e espessura da parede (W):

$$\sigma = \frac{P \times r}{W}$$

Acredita-se que todo o remodelamento vascular ocorre para que o estresse parietal mantenha-se constante. Evidências sugerem (41) que, na HAS, um estímulo neuro-humoral que induza constrição arterial “ativa”, com aumento do estresse intramural e do gasto energético, é progressivamente substituído por uma vasoconstrição “passiva”, estrutural, em que a diminuição radial (r) é compensada pelo aumento da espessura da parede (W), a fim retornar o estresse transmural (σ) aos valores originais. Esse remodelamento eutrófico provavelmente ocorre a partir da reorganização estrutural da matriz e da disposição de células musculares na camada média do vaso (41). Os mecanismos que levam a essa reestruturação estão apenas parcialmente compreendidos.

Dados de estudos *in vitro*, realizados principalmente com cultura organoide *ex vivo* de vasos de pequeno calibre, sugerem papel importante do estímulo adrenérgico (41), angiotensina (42), integrinas, especialmente as subunidades α_V (43) e β_3 (44), metaloproteinase de matriz, especialmente MMP-2, e espécies reativas de oxigênio (45), óxido nítrico (46), além dos estímulos mecânicos, relacionados à pressão arterial, revisados por Feihl *et al* (37).

O processo de remodelamento arteriolar e de arteriolesclerose na retina podem ser desencadeados por fatores miogênicos, endoteliais, ou ainda metabólicos locais, pois, diferentemente das pequenas artérias, os vasos da retina não recebem inervação adrenérgica (47). Entre esses, acredita-se que o óxido nítrico tenha papel importante no estreitamento arteriolar inicial, visto que em indivíduos hipertensos (48), e mesmo em vasos cultivados *ex vivo* (46), a disfunção endotelial pode ser observada.

2.2. – Investigação de mecanismos fisiopatológicos com base na observação da microcirculação da retina

2.2.1 – Importância dos fatores genéticos na determinação do calibre vascular retiniano

O calibre vascular retiniano é uma característica fenotípica cuja expressão tem componente hereditário importante. Análise da agregação familiar dessas características na coorte de Beaver Dam (50) demonstrou coeficientes de correlação (r) para equivalente central da retina arteriolar (CRAE) e venular (CRVE) entre pais e filhos de 0,24 (0,14 – 0,35) e 0,27 (0,16 – 0,37), respectivamente; entre irmãos, CRAV apresentou $r=0,23$ (0,16 – 0,31), e CRVE, $r=0,20$ (0,12 – 0,28). Cônjuges, por sua vez, não apresentaram correlação significativa entre si para essas características. Estudo em gêmeos conduzido na Dinamarca sugere que, ajustando o modelo para sexo, idade e pressão arterial média, 70% da variância do diâmetro das arteríolas e 83% da variância do diâmetro das vênulas pode ser atribuída a fatores genéticos (51). Outro estudo realizado em gêmeos do Reino Unido, e cujo modelo foi validado em amostra de gêmeos australianos, estimou que na primeira coorte, cerca de 60% da variância de arteríolas e vênulas poderia ser atribuída a fatores genéticos na primeira coorte e 70% na segunda. Os autores observaram ainda que, apesar dos calibres de vênulas e arteríolas estarem associados a fatores de risco cardiovascular distintos, 65% (Reino Unido) a 74% (Austrália) da covariância observada entre o calibre de ambos os vasos poderia dever-se a fatores hereditários.

A identificação de componentes genéticos determinantes do calibre vascular retiniano poderia contribuir também para a busca de genes e polimorfismos associados à DCV. O primeiro estudo pan-genômico de associação para calibre vascular retiniano foi realizado na coorte de Beaver Dam (52). Os genes candidatos estão listados na Tabela 2, adaptada da referência (52). Observa-se pouca sobreposição entre a lista de genes potencialmente determinantes do calibre de arteríolas e vênulas; interessante, vários genes envolvidos na síntese de óxido nítrico foram implicados. Estudo de ligação realizado na coorte de gêmeos australianos não reproduziu nenhum dos achados da coorte de Beaver Dam, mas confirmou a baixa concordância entre potenciais determinantes genéticos de arteríolas e vênulas.

Tabela 2: Genes candidatos identificados em estudo de ligação pan-genômico

Região cromossômica	Traço fenotípico	Gene Candidato	Função; via envolvida ou susceptibilidade associada
1p36	CRAE, CRVE	TIE1	Relacionado à via da eNOS
		EPHB2	Receptor de fator de crescimento
		EPHA2	Receptor de fator de crescimento
		EPHA8	Receptor de fator de crescimento
		ID3	Relacionado à via do VEGF
		ECE1	Hipertensão essencial
3q28	CRAE	EPHB3	Receptor de fator de crescimento
		FGF12	Fator de crescimento
5q35	CRAE	VEGFR3	Receptor de fator de crescimento
6p25	CRAE, CRVE	END1	Relacionado à via da eNOS
7q21	CRAE, CRVE	EPHB4	Receptor de fator de crescimento
		HGF	Relacionado à via da eNOS
		EPO	Relacionado à via da eNOS
		CYP3A5	Hipertensão Essencial
7q32	CRAE	EPHA1	Receptor de fator de crescimento
		MET	Relacionado à via da eNOS
		LEP	Relacionado à via da eNOS
8q21	CRVE	ANG1	Relacionado à via da eNOS
11q14	CRAE	VEGFB	Relacionado à via da eNOS
		FZD4	Receptor da família <i>Frizzled</i>
		PCP	Hipertensão essencial
11q24	CRAE	MMP3	Doença Coronariana
13q34	CRVE	EFNB2	Fator de crescimento
14q21	CRVE	HIF1	Relacionado à via da eNOS
17q11	CRAE	NOS2A	Hipertensão Essencial

CRAE: Equivalente central da retina arteriolar; CRVE: Equivalente central da retina venular; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; VEGF: fator de crescimento vascular derivado do endotélio

Adaptado da referência 52.

Até o momento, apenas a associação entre calibre arteriolar retiniano e o gene HGF foi replicada, em uma amostra da população de Singapura (53).

Outros genes não apontados em estudos de varredura pangenômica, mas potenciais candidatos tendo em vista sua associação com alterações cardiovasculares, já foram alvo de investigação. Polimorfismo de único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism*, SNP) dos genes ACE, codificante da enzima conversora da angiotensina (54), e AGTR2, codificante do receptor tipo 2 de angiotensina II (55), foram associados a calibre arteriolar retiniano. No entanto, não se identificou associação com SNPs dos genes ADD1, ADRB2, GNB3 (56) APOE (57) e CFH (58). A identificação de determinantes genéticos do calibre vascular retiniano tem se mostrado um desafio, seja pela abordagem pangenômica ou de genes candidatos com base no conhecimento fisiopatológico.

2.2.2 – Óxido nítrico e óxido nítrico sintase endotelial

Entre os genes identificados em estudo de ligação pan-genômico, listados anteriormente, chama a atenção o número de candidatos associados à via de síntese do óxido nítrico (NO), chamando a atenção para o potencial papel do mesmo na fisiopatologia da microcirculação retiniana. O NO é um radical livre, que por suas características químicas tem a propriedade de se ligar a moléculas iônicas, ativando rotas bioquímicas intracelulares. É rapidamente inativado, sendo produzido obrigatoriamente próximo às células-alvo para exercer suas funções. Por ser um gás, tem capacidade de difusão através do citosol e das membranas lipídicas. É

sintetizado a partir da L-arginina em reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (47).

Existem no corpo humano três isoformas da enzima, cada qual transcrita a partir de um gene específico. A NOS neuronal (nNOS ou isoforma I) é expressa em neurônios e células gliais; nesses tecidos, NO tem função neurotransmissora. NOS induzível (iNOS ou isoforma II) é expressa na presença de estímulos imunológicos e inflamatórios. NOS endotelial (eNOS ou isoforma III) é transcrita a partir do gene NOS3, localizado no braço longo do cromossomo 7. Na retina, nNOS e eNOS são expressas. A nNOS é responsável pela liberação de NO nas células ganglionares, células horizontais, fotorreceptores e células de Müller. As células endoteliais dos vasos da retina e coroide são as principais células que expressam eNOS, cujo mRNA também é encontrado nos pericitos dos capilares (47). Em modelos animais, demonstrou-se que o NO é importante regulador da microcirculação da retina (59), sugerindo, portanto que sua rota de produção, inclusive a eNOS, pode ter papel importante nas alterações microvasculares.

A enzima eNOS e seus polimorfismos vêm sendo estudados no contexto das doenças cardiovasculares. Considerando HAS e pressão arterial, revisão sistemática com meta-análise de 53 estudos estimou as razões de chance (*odds ratio*, OR) para três polimorfismos do gene NOS3. O polimorfismo G894T, uma mutação *missense* que leva a troca de um resíduo de glutamato por aspartato na posição 298, foi associado a níveis de pressão sistólica e diastólica aproximadamente 2 mmHg mais elevados e a 28% (IC 95% 1,06 – 1,54) de aumento na chance de hipertensão entre indivíduos de ascendência oriental carreadores do alelo T em comparação aos indivíduos homocigotos para o alelo G. Na análise incluindo todos os estudos, estimou-se OR=1,06 (0,96 – 1,17) para HAS entre indivíduos homo- ou heterocigotos

para o alelo T. Ainda nesse estudo foi identificada associação entre HAS e a presença de inserções de 27 pares de base em número variável de repetições em tandem (*variable number of tandem repeats*, VNTR) no íntron 4 (4b/a). Esse achado, no entanto, pode se dever a viés de publicação. Nenhuma associação foi encontrada com o SNP T-786C, localizado na região promotora do gene (60).

Uma metanálise mais recente, incluindo 74 estudos, também evidenciou associação entre o polimorfismo G894T e HAS, apenas significativa entre estudos publicados em chinês. Apesar de não discriminar exatamente a ascendência da população estudada, essa informação reforça a importância desse polimorfismo em um grupo étnico específico. O polimorfismo 4b/a associou-se à maior chance de HAS em estudos publicados em inglês e em chinês, e não foi identificado viés de publicação. A presença da variante b acarretou maior chance de apresentar desfecho [OR=1,29 (1,13 – 1,46)] quando todos os estudos foram considerados (61).

Metanálise de estudos que investigaram doença coronariana como desfecho clínico identificou associação significativa com os polimorfismos G894T [OR=1,17 (1,07 – 1,28)], T-786C [OR=1,17 (1,07 – 1,28)] e 4b/a [OR=1,12 (1,01 – 1,24)] para o modelo de risco aditivo. Analisando padrões de herança, a suposição de um modelo recessivo revela associações de magnitude ainda mais significativa com o desfecho para os três polimorfismos (62).

Alguns estudos sobre polimorfismos do gene NOS3 foram conduzidos em amostras de indivíduos brasileiros. Sandrim e colaboradores (63) analisaram haplótipos incluindo os três polimorfismos já mencionados entre 116 indivíduos hipertensos controlados, 100 hipertensos resistentes e 111 indivíduos normotensos. Os grupos eram semelhantes em relação às características estudadas, exceto pressão, mais

elevada no grupo com HAS resistente. O haplótipo C-Glu-b foi significativamente mais frequente entre os normotensos do que nos demais grupos, enquanto o haplótipo C-Asp-b foi significativamente mais frequente entre participantes com HAS controlada e com HAS resistente. A análise individual dos *loci* não evidenciou diferenças entre os três grupos. Não se identificou associação entre polimorfismos do gene NOS3 e resistência ao tratamento anti-hipertensivo.

O mesmo grupo de pesquisadores estudou ainda a associação de haplótipos do gene NOS3 e retinopatia diabética (RD) (64). Cento e setenta indivíduos diabéticos tipo 2 foram comparados a 103 voluntários não diabéticos e classificados quanto à presença de RD, avaliada por oftalmoscopia indireta e análise qualitativa de retinografias. Nenhum haplótipo associou-se a aumento de chance de RD, mas o haplótipo C-Glu-b mais uma vez foi mais frequente em indivíduos que não apresentavam o defeito.

Um dos aspectos importantes dos dois últimos estudos citados é a informação genotípica de uma amostra de indivíduos brasileiros. A frequência alélica observada nos estudos está resumida na Tabela 3. Fica claro tratar-se de polimorfismos frequentes na nossa população, reforçando a importância de aprofundar o conhecimento sobre suas implicações clínicas.

Dentre os polimorfismos do gene NOS3 mais estudados, dois encontram-se em regiões não codificantes – na região promotora e no quarto íntron. Mutações nesses locais podem alterar regulação da expressão da proteína. No entanto, o único SNP que modifica a sequência de aminoácidos da enzima é o SNP G892T (Glu298Asp).

Tabela 3. Distribuição genotípica em amostras de indivíduos brasileiros

Estudo	G894T (Glu298Asp)			T-786C			Íntron 4		
	GG	GT	TT	TT	TC	CC	bb	ba	aa
Sandrim et al. (2006)									
Normotensos	0,49	0,43	0,08	0,39	0,50	0,11	0,73	0,22	0,05
Hipertensos	0,43	0,47	0,10	0,40	0,47	0,13	0,69	0,27	0,04
Hipertensos Resistentes	0,45	0,47	0,08	0,41	0,48	0,11	0,68	0,26	0,06
de Syllos et al. (2006)									
Não diabéticos	0,52	0,44	0,04	0,37	0,51	0,12	0,77	0,19	0,04
Diabéticos sem retinopatia	0,49	0,45	0,05	0,45	0,45	0,10	0,74	0,23	0,3
Diabéticos com retinopatia	0,44	0,48	0,08	0,45	0,48	0,7	0,69	0,29	0,02

Evidências sobre repercussão funcional da enzima decorrente dessa troca de resíduos são controversas. Um estudo de casos e controles realizados na Coréia do Sul identificou que níveis plasmáticos de NOx (nitrato e nitrito) eram mais elevados entre indivíduos que sofreram infarto agudo do miocárdio (casos), especialmente os hipertensos, em comparação ao grupo controle (sem infarto agudo do miocárdio), pareados por idade com os casos. Entre casos, o polimorfismo Glu298Asp não se associou com níveis plasmáticos de NOx, mas controles portadores do alelo Asp apresentaram níveis elevados de NOx (65). Outro estudo realizado em homens atendidos em clínicas de atenção básica do Reino Unido não encontrou associação entre polimorfismos do NOS3, níveis de NOx e risco de DAC. No entanto, apenas 15 casos foram registrados, limitando o poder estatístico do estudo (66).

Considerando a importância do óxido nítrico no remodelamento de pequenas artérias (46) e da regulação da circulação da retina (67), investigar a associação entre o polimorfismo Glu298Asp do gene NOS3 pode ampliar a compreensão do papel dessa variação, comumente observada em nossa população, no remodelamento microvascular, potencialmente contribuindo para clarificar a relação desse polimorfismo com susceptibilidade à doença cardiovascular.

2.2.3 – Adiponectina: nova interação entre sistemas endócrino e cardiovascular

Adiponectina (APN) é uma proteína de 30 kDa, sendo o tecido adiposo a principal fonte desse peptídeo. A concentração sérica de APN tem relação inversa com o volume de tecido adiposo, principalmente o visceral (68). APN circula em diversas formas no plasma, sendo a forma multimérica de alto peso molecular (high molecular weight – HMW) a mais abundante (69). Análise proteômica por cromatografia multidimensional e espectroscopia de massa identificou oito proteínas plasmáticas que potencialmente associam-se à adiponectina circulante, sendo que duas dessas – trombospondina 1 (TSP-1) e Alfa2M – foram investigadas detalhadamente e demonstraram-se ligantes de APN de maneira dose-dependente. Interessantemente, TSP-1 é uma proteína de matriz extracelular associada à migração celular e remodelamento tissular na microcirculação (70).

Em modelos experimentais, identificou-se que adiponectina era capaz de elevar a sensibilidade à insulina em hepatócitos isolados, diminuindo a produção de glicose, além de aumentar oxidação e reduzir a síntese de ácidos graxos no tecido hepático

(71). Em uma amostra de 245 homens japoneses com $53,6 \pm 7,5$ anos de idade e índice de massa corporal 25 ± 3 kg/m², níveis plasmáticos de adiponectina correlacionaram-se a menor concentração de triglicérides em todas as lipoproteínas e a maior concentração de colesterol nas partículas de HDL e LDL, o que já foi associado à redução de risco de doença arterial coronariana (72).

Atuando sobre o tecido muscular, adiponectina promove oxidação de ácidos graxos e captação de glicose através da translocação de receptores GLUT4, estando envolvida também na sensibilidade do músculo à insulina (71). Evidências sugerem papel regulatório da APN sobre a inflamação em seres humanos, por interferir, por exemplo, na ativação de linfócitos T (73) e na expressão de moléculas de adesão celular-I (I-CAM) induzida por fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) in vitro (74).

Por suas propriedades sobre o metabolismo glicídico e lipídico e sobre a inflamação, hipotetizou-se que adiponectina poderia ser protetora contra doenças cardiometabólicas. Estudos transversais identificaram associação inversa entre síndrome metabólica e seus componentes e valores circulantes de adiponectina (69, 75) e de seus multímeros, especialmente o de alto peso molecular (76). Posteriormente, estudos de coorte (77, 78) demonstraram papel protetor da adiponectina sobre a incidência de síndrome metabólica em seis e sete anos de seguimento.

Em relação ao papel protetor da APN sobre a incidência de diabetes mellitus, foi realizada revisão sistemática com meta-análise de estudos prospectivos. Análise conjunta de 13 estudos, conduzidos em indivíduos sem doenças prévias, permitiu estimar que cada incremento de 1-log nos valores basais de APN ($\mu\text{g/mL}$) reduziu

em 28% a incidência de diabetes (razão de risco (RR) = 0,72; 0,67-0,78), independentemente de adiposidade corporal e outros confundidores (79).

Hipoadiponectinemia foi identificada entre indivíduos hipertensos em pelo menos duas populações distintas. Um estudo de casos e controles realizado no Japão (80) apontou menor concentração plasmática de APN entre casos com HAS do que entre controles normotensos, independentemente de idade, índice de massa corporal e colesterol total ($5,2 \pm 0,2$ vs. $6,1 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$; $P < 0,001$). Em uma amostra de indivíduos brasileiros obesos (81), análise transversal identificou associação inversa entre adiponectina e hipertensão, com coeficiente de determinação parcial de aproximadamente 6% (coef. β -0,336; $P < 0,0001$) independente de idade, índice de massa corporal e índice de resistência insulínica (HOMA-IR).

Adiponectina reduzida no plasma também foi associada à aterosclerose. Entre indivíduos submetidos a estudo angiográfico por indicação clínica, APN associou-se inversamente com a presença de lesões significativas ao exame (exame positivo: $4,14 \pm 3,83$ vs. exame negativo: $8,94 \pm 6,63$ $\mu\text{g/ml}$, $P < 0,001$) (82). Outro estudo transversal avaliou características qualitativas de placas ateroscleróticas coronarianas através de ultra-som intravascular (IVUS), identificando associação inversa entre APN e volume e presença de calcificação nas placas (83). Indivíduos que se apresentaram no serviço de emergência com dor torácica, sem diagnóstico de síndrome coronariana aguda (SCA) após avaliação inicial, foram submetidos à angiografia por tomografia computadorizada (84). Indivíduos sem placas calcificadas ($n=15$) apresentaram menores concentrações de adiponectina sérica quando comparados àqueles sem placas ($n=168$) ou com qualquer calcificação ($n=130$), após ajuste para idade, gênero, diabetes, HAS, hiperlipoproteinemia, tabagismo e

medicações em uso [estatinas, β -bloqueadores e inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA)]. Placas não calcificadas são consideradas um estágio de evolução da aterosclerose que precede o processo de calcificação das placas, e são frequentemente identificadas como as lesões que originam SCA. De fato, indivíduos nesse grupo eram mais jovens ($48,7 \pm 5,0$ vs $58,2 \pm 11,2$ anos).

Estudos prospectivos testaram a hipótese de que níveis reduzidos de APN aumentam o risco de doença coronariana também aferida por desfechos duros. Apesar de alguns achados negativos (85, 86), um grande número de estudos corrobora essa hipótese. Metanálise publicada em 2006 (86) identificou que APN, tercil superior versus tercil inferior, associou-se à doença arterial coronariana incidente em quatro estudos de coorte; a razão de chances sumária foi 0,81 (IC 95%: 0,67 – 0,97). No entanto, a meta-análise não se baseou em uma revisão sistemática bem estruturada, não avaliou viés de publicação, e vários estudos foram publicados posteriormente. Associação independente foi identificada entre homens no estudo *Framingham Offspring Study*. Contudo, entre mulheres, a associação entre APN e DAC incidente não se manteve após ajuste para múltiplos confundidores (87).

Em estudo de casos e controles aninhado ao *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study* (88), foi detectada associação entre níveis basais de adiponectina e doença arterial coronariana incidente, mas não se manteve estatisticamente significativa após ajuste para fatores de confusão, constituídos pelos fatores de risco clássicos. O mesmo ocorreu em uma coorte alemã (89). Na análise univariada, *hazard ratio* (HR) para doença arterial coronariana chegou a ser igual a 0,56 (0,36 – 0,87) na comparação entre o primeiro e o terceiro tercil de adiponectina. Essa relação perdeu a significância estatística no modelo multivariado. Resultados

semelhantes foram obtidos analisando a coorte de Rancho Bernardo (90) e uma coorte de homens diabéticos tipo 2 (91). Já entre diabéticos tipo 1 (92), o incremento de 1 µg/ml nas concentrações séricas de APN representou um HR=0,37 (IC 95%: 0,18–0,79) para DAC.

Em idosos, os resultados apresentaram maior heterogeneidade. Estudo que incluiu homens residentes em Uppsala, Suécia (93), demonstrou em análise transversal que, aos 70 anos, para cada aumento em um desvio padrão nos valores de APN houve 16% de redução na chance de apresentar DAC [OR=0,84 (IC 95%: 0,71–1,00), P=0.049]. No seguimento de 10 anos dos indivíduos hígidos na linha de base, em um estudo de casos e controles aninhado à coorte, APN teve efeito protetor contra o desfecho combinado de IAM não fatal e morte por DAC. Essa associação foi independente de idade, pressão arterial sistólica, colesterol total, colesterol HDL e índice de massa corporal. A associação foi estatisticamente significativa mesmo controlando para variáveis indicativas de resistência insulínica. Outro estudo com indivíduos de idade avançada, hígidos ou não na linha de base, detectou associação oposta (94).

Em uma subamostra do *Cardiovascular Health Study – All Star Study* (95), a variação de adiponectina ao longo do seguimento e fatores associados à mesma, bem como desempenho físico e mortalidade geral, foram investigados. Em nove anos de seguimento, adiponectina plasmática aumentou $3,3 \pm 5,0$ mg/l em homens e $2,5 \pm 4,7$ mg/l em mulheres. A Tabela 4 apresenta os fatores associados à variação na adiponectinemia.

Tabela 4. Fatores associados à variação de adiponectina plasmática

Fator de risco	Mulheres (n=614)	Homens (n=347)
	Coeficiente* (IC 95%)	Coeficiente* (IC 95%)
Idade, por ano	0,14 (0,04 – 0,24)	-0,06 (-0,19 – 0,07)
Raça negra	-1,09 (-2,02 – -0,16)	-0,51 (-1,82 – 0,81)
Δ Peso, por 6,8 kg	-1,28 (-1,62 – -0,95)	-1,87 (-2,37 – -1,37)
Δ Glicemia, por 25 mg/dl	-1,25 (-1,65 – -0,85)	-0,58 (-0,98 – -0,18)
Albuminemia (basal), por 0,29 g/dl	-	-0,98 (-1,4 – -0,56)
B-bloqueador (basal)	1,62 (0,62 – 2,61)	1,75 (0,37 – 3,12)
B-bloqueador (seguimento)	-1,75 (-2,49 – -1,01)	-1,59 (-2,59 – -0,60)
ARAI (seguimento)	-	1,79 (0,34 – 3,23)

*Coeficientes da regressão linear múltipla; Δ= variação entre linha de base (1997-1998) e seguimento (2005-2006). Adaptado da referência 95.

A relação entre variação no peso em ambos os sexos e ainda albuminemia basal entre homens chama a atenção para a associação conhecida entre adiponectina e caquexia (96). No que diz respeito à resistência periférica à adiponectina, a variação inversa da glicemia fala contra essa hipótese, pois um aumento de adiponectina associou-se à melhora do perfil glicêmico, como esperado. A relação aparentemente ambígua com relação ao uso de β -bloqueadores poderia ser explicada se considerarmos que indivíduos em uso na linha de base já deveriam ter níveis mais baixos de adiponectina, enquanto que o uso iniciado durante o seguimento levaria à redução da adiponectinemia na segunda aferição. A relação entre uso de β -bloqueadores e adiponectina será discutida no contexto da insuficiência cardíaca.

Ainda nesse estudo, os valores de adiponectina durante o seguimento se associaram a aumento de mortalidade entre indivíduos brancos, mas não entre os da raça negra. Na amostra geral, a cada aumento em um desvio-padrão na adiponectinemia durante o seguimento, foi observado aumento significativo de 22% no risco de morte (HR=1,22, IC 95% 1,03 – 1,45), ajustado para idade, sexo, raça, peso e variação no peso, DM, consumo de álcool, DCV, saúde debilitada autorrelatada, proteína C reativa e valor de adiponectina durante o seguimento. Sumarizando, em idosos, aumento de adiponectina está associado a maior mortalidade, e os mecanismos que explicam essa relação paradoxal ainda não estão estabelecidos, mas pode estar associado a um aumento compensatório da produção do hormônio para contrapor os danos causados pelo envelhecimento.

Adiponectina foi investigada como marcador prognóstico em pacientes com doença arterial coronariana. Estudo de coorte que arrolou 499 indivíduos submetidos a estudo angiográfico de coronárias por indicação clínica apontou que APN basal exerceria proteção contra incidência de síndromes coronarianas instáveis (a cada 5 µg/mL OR=0,61; IC 95%: 0,46–0,81), independente de fatores de confusão (97). Em indivíduos com doença já estabelecida, entretanto, efeito protetor da APN sobre eventos cardiovasculares subsequentes não foi confirmado na maioria dos estudos realizados nessa população. Considerando outro estudo que incluiu pacientes com indicação clínica de investigação de cardiopatia isquêmica, uma coorte de 3146 indivíduos seguidos por uma mediana de 5,45 anos registrou 482 óbitos. Cada desvio-padrão de incremento nos níveis basais de adiponectina acarretou 22% de aumento no risco para mortalidade por qualquer causa [HR= 1,22 (IC 95%: 1,12–1,34)], ajustado para diversos fatores de risco, incluindo presença de aterosclerose coronariana significativa (>20% obstrução) na linha de base, perfil lipídico e NT-pró-

BNP. APN apresentou associação direta com mortalidade cardiovascular e não cardiovascular, e a associação era ainda mais clara na presença de disfunção sistólica (98). Resultados de um estudo de coorte com menor número de participantes (712 indivíduos) com critérios de inclusão semelhantes apresentaram a mesma tendência (99).

Considerando indivíduos com qualquer manifestação clínica de doença aterosclerótica, 216 casos com novo evento cardiovascular foram comparados a 215 indivíduos da mesma população sem evento novo. Após seguimento de 2,3 anos (mediana), indivíduos no primeiro quartil de adiponectina, comparados com o quartil mais alto, apresentaram HR=0,48 (IC 95%: 0,23-1,00) controlando para idade, gênero, índice de massa corporal, função renal, PCR, uso de iECA ou antagonista dos receptores de angiotensina II (ARAII), mas não para lipídemia (100).

Dois estudos investigaram, de maneira prospectiva, o significado prognóstico em pacientes com doença arterial coronariana estabelecida. Mil novecentos e vinte e quatro pacientes atendidos por dor torácica aguda ou crônica e submetidos à cineangiocoronariografia, com presença de estenoses de pelo menos 30% da luz das artérias coronárias, foram acompanhados por uma mediana de 2,5 anos. Entre indivíduos que na linha de base apresentaram síndrome coronariana aguda não foi evidenciada associação. Entre aqueles com angina estável, no entanto, o incremento de 1 µg/ml se associou a um aumento de 3,5% no risco de desenvolver eventos cardiovasculares maiores (HR=1,035; IC95% 1,008 – 1,062), ajustado para diversas covariáveis, inclusive perfil lipídico e uso de medicações (101). Já no seguimento de 3931 pacientes incluídos após síndrome coronariana aguda no Estudo PROVE-IT – TIMI-22, APN acima da mediana do estudo (4,4 µg/ml) associou-se a maior

incidência do desfecho primário composto (HR=1,2; IC 95%: 1,03 – 1,4), insuficiência cardíaca (HR=1,72; IC 95%: 1,24 – 2,39) e IAM (HR=1,48; IC 95%: 1,11 – 1,99) em dois anos, ajustado para diversos confundidores, inclusive braço de randomização (pravastatina) e triglicerídeos, mas não para colesterol (102). Outro estudo, incluindo pacientes pós-revascularização encontrou associação semelhante apenas para indivíduos diabéticos (103), o que pode ter ocorrido por falta de poder estatístico no teste de associação.

O valor prognóstico da adiponectina é paradoxal e ainda mais marcado entre indivíduos com insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Em 2005, levantando a hipótese de que APN poderia ser um marcador envolvido no paradoxo da obesidade em indivíduos com ICC (maior índice de massa corporal se associou a maior sobrevida), pesquisadores publicaram dados referentes a 195 pacientes ambulatoriais com fração de ejeção $\leq 45\%$ e seguimento por um período de seis meses a 3,9 anos. Na comparação de indivíduos nos dois tercís superiores de APN àqueles no primeiro tercil, após ajuste para múltiplas variáveis (índice de massa corporal, pressão arterial sistólica, FE $<25\%$ e ainda NT-pró-BNP), o HR para morte por qualquer causa foi de 3,23 (IC 95%: 1,11–9,69) (104). Outro estudo, em pacientes com ICC descompensada (105), demonstrou resultados consonantes. Ainda, em um estudo de coorte com 4046 homens, com média de idade em torno de 70 anos, acompanhados por seis anos, demonstrou a mesma associação paradoxal entre APN sérica circulante e aumento de mortalidade cardiovascular e por qualquer causa, significativa para homens sem doença cardiovascular prevalente e para aqueles com insuficiência cardíaca (106).

Algumas explicações foram aventadas, mas ainda não há evidências suficientes para adequada compreensão desse fenômeno. Boa resposta ao tratamento da ICC – que não costuma ser incluída como variável confundidora – parece diminuir os níveis circulantes de APN (107). A instituição de tratamento com β -bloqueadores, terapia padrão, capaz de alterar a sobrevida de indivíduos com insuficiência cardíaca, foi um dos determinantes da redução de adiponectina circulante nesses pacientes (108). Ainda, caquexia cardíaca, frequente entre pacientes com ICC, aumenta a concentração de APN, podendo ser a real causadora do aumento de mortalidade (96). Essa explicação, no entanto, não parece ser suficiente no caso de indivíduos de alto risco ou com doença arterial coronariana sem insuficiência cardíaca, já que a caquexia, nesse contexto, não costuma ser observada. Em 2010, van Berendoncks e col. (109) demonstraram a ocorrência de resistência periférica à APN em pacientes com ICC. Eles apontaram a redução da expressão de RNA mensageiro de receptores e aumento da expressão de adiponectina em células musculares esqueléticas nesses indivíduos em comparação a controles saudáveis.

Enquanto evidências epidemiológicas sobre a relação entre adiponectina e doenças cardiovasculares somam-se, sem que seu papel esteja claramente definido, estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* têm reproduzido de maneira mais consistente seus efeitos protetores sobre tecido miocárdico e vascular.

2.2.4 – Adiponectina e remodelamento vascular

Em relação ao remodelamento macrovascular entre indivíduos hipertensos, adiponectina apresentou papel protetor, detectado em estudo transversal, estando inversamente associada à velocidade de onda de pulso (110), enquanto em estudo de coorte, associou-se inversamente ao risco de progressão da rigidez arterial (111).

Quanto à microcirculação, apenas um estudo transversal avaliou associação entre adiponectina e retinopatia hipertensiva. A concentração de adiponectina foi em média 20 ng/dl menor entre indivíduos hipertensos com retinopatia graus 3 e 4 na classificação de Keith-Wagener em comparação aos indivíduos com grau 1 (112). Nenhum estudo, até o momento, avaliou associação entre adiponectina e calibre vascular retiniano.

Em estudos em modelos animais, adiponectina reduz a formação de neovasos na retina submetida à hipóxia (113) e tiazolidinedionas são eficazes em reduzir a neovascularização apenas em animais que expressam o gene da adiponectina (114). Esses estudos sugerem que adiponectina pode influenciar diretamente a microcirculação da retina.

Adiponectina também se associa inversamente com proteinúria de baixo grau em indivíduos hipertensos obesos não diabéticos (115), apesar de apresentar associação paradoxalmente direta com graus avançados de proteinúria, doença renal crônica e mortalidade (116, 117). Experimentos em modelos animais sugerem que depleção de adiponectina leva à redução dos níveis de *AMP-activated protein kinase* (AMPK) nos glomérulos. As alterações morfológicas nos podócitos glomerulares foram observadas, com apagamento dos processos podais, o que poderia explicar albuminúria (118).

Alguns estudos têm investigado o efeito protetor da adiponectina sobre o tecido miocárdico. Submetendo cardiomiócitos a estímulo hipertrófico por estresse oxidativo, identificou-se a importância de vias associadas à estimulação de AMPK e concomitante redução da ativação de fator nuclear κ -B (NF κ B), *extracellular regulated protein kinase* (ERK) e MMPs, sugerindo efeito anti-proliferativo e anti-hipertrófico da APN (119, 120). Demonstrou-se também que estímulo hipertrófico por sinalização adrenérgica envolvendo ativação de *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR- γ) é capaz de induzir produção de APN por cardiomiócitos, sugerindo ação autócrina ou parácrina (121).

Pouco se sabe, no entanto, sobre os mecanismos que envolvem a ação da APN sobre o remodelamento vascular. Um estudo sobre células isoladas a partir de tecido aórtico humano evidenciou que APN reduzia replicação e migração celular, além de diminuir a fosforilação de ERK, induzidas por fator de crescimento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) (122). O mecanismo de inibição parecia relacionado à capacidade da APN de ligar-se ao PDGF-BB, impedindo sua ação. Como já mencionado, o PDGF-BB pode estar associado ao remodelamento da microcirculação, apesar de, no contexto da hipertensão não parecer ser um fator crucial. Se a APN é capaz de exercer efeitos diretos sobre o remodelamento microvascular, e através de que mecanismos, ainda são temas vagamente compreendidos.

3. Justificativa

Os estudos epidemiológicos produzidos em Porto Alegre, no Brasil e no mundo geraram informações sobre fatores de risco para doença arterial coronariana, possibilitando o desenvolvimento de intervenções preventivas primárias e secundárias, cuja efetividade está bem documentada na literatura. Entretanto, os elos entre os eixos de investigação etiológica em modelos experimentais e de base epidemiológica são menos frequentes, pois o primeiro eixo usualmente desconsidera o papel do ambiente, incluindo-se nesse o social, na etiologia de doenças.

Indivíduos hipertensos têm alta prevalência de outras comorbidades, como já demonstrado, e estão em risco de desenvolver alterações vasculares no fundo de olho. O estudo das imagens da retina permite visualização direta dos processos patológicos, seja por remodelamento vascular ou disfunção endotelial, que podem ser relacionados com exposições em diferentes níveis de complexidade.

Nesse projeto buscou-se integrar o conhecimento epidemiológico com dados experimentais para a investigação fisiopatológica da doença cardiovascular em seres humanos. A base advinda de animais de experimentação, modelos em tecidos ou órgãos isolados e outras técnicas geram conhecimento que precisa ser transladado para seres humanos. A complexidade da experimentação em indivíduos necessita de modelos de patogenia próprios, testados em condições reais de vida na qual os indivíduos definem suas exposições, sejam de risco ou proteção, e adotam comportamentos e estilos de vida que não são controlados e modificam as respostas ao processo de saúde-doença.

4. Referências

1. Poulter N. Coronary heart disease is a multifactorial disease. *Am J Hypertens* 1999;**12**:92S-5S.
2. Cowley AW, Nadeau JH, Baccarelli A, Berecek K, Fornage M, Gibbons GH *et al*. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group on epigenetics and hypertension. *Hypertension* 2012;**59**:899-905.
3. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC and Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol* 1997;**26**:224-7.
4. Alwan A, Maclean DR, Riley LM, d'Espaignet ET, Mathers CD, Stevens GA *et al*. Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *Lancet* 2010;**376**:1861-8.
5. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM *et al*. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet* 2011;**377**:1949-61.
6. World Health Organization. Global Health Risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: WHO Press, 2009. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf - Último acesso em 23 de Agosto de 2012.
7. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R and Collaboration PS. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002;**360**:1903-13.
8. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional por amostra de domicílios (PNAD 2008), um panorama da Saúde no Brasil: acesso e utilização dos

serviços, condições de saúde e fatores de risco e proteção à saúde. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pnad_2008_saude_final.pdf - Último acesso em 23 de Agosto de 2012.

9. Moreira LB, Fuchs SC, Wiehe M, Gus M, Moraes RS and Fuchs FD. Incidence of hypertension in Porto Alegre, Brazil: a population-based study. *J Hum Hypertens* 2008;**22**:48-50.
10. Udani S, Lazich I and Bakris GL. Epidemiology of hypertensive kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011;**7**:11-21.
11. Klein R, Myers CE, Lee KE and Klein BE. 15-year cumulative incidence and associated risk factors for retinopathy in nondiabetic persons. *Arch Ophthalmol* 2010;**128**:1568-75.
12. Lam DS, Chan W. Images in clinical medicine. Choroidal ischemia in preeclampsia. *N Engl J Med* 2001;**344**:739.
13. Somfai GM, Miháltz K, Tulassay E and Rigó J. Diagnosis of serous neuroretinal detachments of the macula in severe preeclamptic patients with optical coherence tomography. *Hypertens Pregnancy* 2006;**25**:11-20.
14. Keith NM, Wagener HP, Barker NW. Some different types of essential hypertension: their course and prognosis. *Am J Med Sci* 1939;**197**:332-343.
15. van den Born BJ, Hulsman CA, Hoekstra JB, Schlingemann RO and van Montfrans GA. Value of routine funduscopy in patients with hypertension: systematic review. *BMJ* 2005;**331**:73.
16. Fuchs FD, Maestri MK, Bredemeier M, Cardozo SE, Moreira FC, Wainstein MV *et al.* Study of the usefulness of optic fundi examination of patients with hypertension in a clinical setting. *J Hum Hypertens* 1995;**9**:547-51.

17. McGeechan K, Liew G, Macaskill P, Irwig L, Klein R, Klein BE *et al.* Prediction of incident stroke events based on retinal vessel caliber: a systematic review and individual-participant meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2009;**170**:1323-32.
18. McGeechan K, Liew G, Macaskill P, Irwig L, Klein R, Klein BE *et al.* Meta-analysis: retinal vessel caliber and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 2009;**151**:404-13.
19. Ikram MK, de Jong FJ, Vingerling JR, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM *et al.* Are retinal arteriolar or venular diameters associated with markers for cardiovascular disorders? The Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;**45**:2129-34.
20. Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Wong TY and Tsai MY. Are inflammatory factors related to retinal vessel caliber? The Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2006;**124**:87-94.
21. Arthur HM, Campbell P, Harvey PJ, McGillion M, Oh P, Woodburn E *et al.* Women, cardiac syndrome X, and microvascular heart disease. *Can J Cardiol* 2012;**28**:S42-9.
22. Rizzoni D, Palombo C, Porteri E, Muiesan ML, Kozàková M, La Canna G *et al.* Relationships between coronary flow vasodilator capacity and small artery remodelling in hypertensive patients. *J Hypertens* 2003;**21**:625-31.
23. Nguyen TT, Wang JJ, Islam FM, Mitchell P, Tapp RJ, Zimmet PZ *et al.* Retinal arteriolar narrowing predicts incidence of diabetes: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle (AusDiab) Study. *Diabetes* 2008;**57**:536-9.
24. Kifley A, Wang JJ, Cugati S, Wong TY and Mitchell P. Retinal vascular caliber and the long-term risk of diabetes and impaired fasting glucose: the Blue Mountains Eye Study. *Microcirculation* 2008;**15**:373-7.
25. Wong TY, Shankar A, Klein R, Klein BE and Hubbard LD. Prospective cohort study of retinal vessel diameters and risk of hypertension. *BMJ* 2004;**329**:79.

26. Chew SK, Xie J and Wang JJ. Retinal arteriolar diameter and the prevalence and incidence of hypertension: a systematic review and meta-analysis of their association. *Curr Hypertens Rep* 2012;**14**:144-51.
27. Park JB and Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens* 2001;**19**:921-30.
28. Folkow B. The structural factor in hypertension, with special emphasis in the altered geometric design of the systemic resistance arteries. In: Laragh JH, Brenner BM (editors):Hypertension: physiology, diagnosis, and management, 2nd edn.; New York: Raven Press, 1995, ch. 31.
29. Li JS and Schiffrin EL. Effect of calcium channel blockade or angiotensin-converting enzyme inhibition on structure of coronary, renal, and other small arteries in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;**28**:68-74.
30. Rizzoni D, Porteri E, Duse S, De Ciuceis C, Rosei CA, La Boria E *et al.* Relationship between media-to-lumen ratio of subcutaneous small arteries and wall-to-lumen ratio of retinal arterioles evaluated noninvasively by scanning laser Doppler flowmetry. *J Hypertens* 2012;**30**:1169-75.
31. Maestri MM, Fuchs SC, Ferlin E, Pakter HM, Nunes G, Moraes RS *et al.* Detection of arteriolar narrowing in fundoscopic examination: evidence of a low performance of direct ophthalmoscopy in comparison with a microdensitometric method. *Am J Hypertens* 2007;**20**:501-5.
32. Hubbard LD, Brothers RJ, King WN, Clegg LX, Klein R, Cooper LS *et al.* Methods for evaluation of retinal microvascular abnormalities associated with hypertension/sclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Ophthalmology* 1999;**106**:2269-80.

33. Wong TY, Knudtson MD, Klein R, Klein BE, Meuer SM and Hubbard LD. Computer-assisted measurement of retinal vessel diameters in the Beaver Dam Eye Study: methodology, correlation between eyes, and effect of refractive errors. *Ophthalmology* 2004;**111**:1183-90.
34. Gao XW, Bharath A, Stanton A, Hughes A, Chapman N and Thom S. Quantification and characterisation of arteries in retinal images. *Comput Methods Programs Biomed* 2000;**63**:133-46.
35. Pakter HM, Ferlin E, Fuchs SC, Maestri MK, Moraes RS, Nunes G *et al*. Measuring arteriolar-to-venous ratio in retinal photography of patients with hypertension: development and application of a new semi-automated method. *Am J Hypertens* 2005;**18**:417-21.
36. Pakter HM, Fuchs SC, Maestri MK, Moreira LB, Dei Ricardi LM, Pamplona VF *et al*. Computer-assisted methods to evaluate retinal vascular caliber: what are they measuring? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;**52**:810-5.
37. Feihl F, Liaudet L, Levy BI and Waeber B. Hypertension and microvascular remodelling. *Cardiovasc Res* 2008;**78**:274-85.
38. Folkow B. The 'structural factor' in hypertension, with special emphasis on the hypertrophic adaptation of the systemic resistance vessels. In: Laragh JH, Brenner BM (ed.), *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment*. New York, Raven Press, Ltd; 1990. p565-581.
39. Schoenhagen P and Sipahi I. Arterial remodelling: an independent pathophysiological component of atherosclerotic disease progression and regression. Insights from serial pharmacological intervention trials. *Eur Heart J* 2007;**28**:2299-300.
40. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Valentini U, Cimino A *et al*. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 2001;**103**:1238-44.

41. Martinez-Lemus LA, Hill MA, Bolz SS, Pohl U and Meininger GA. Acute mechanoadaptation of vascular smooth muscle cells in response to continuous arteriolar vasoconstriction: implications for functional remodeling. *FASEB J* 2004;**18**:708-10.
42. Intengan HD and Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001;**38**:581-7.
43. Heerkens EH, Shaw L, Ryding A, Brooker G, Mullins JJ, Austin C *et al.* α V integrins are necessary for eutrophic inward remodeling of small arteries in hypertension. *Hypertension* 2006;**47**:281-7.
44. Bakker EN, Buus CL, VanBavel E and Mulvany MJ. Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *J Vasc Res* 2004;**41**:174-82.
45. Martinez-Lemus LA, Zhao G, Galiñanes EL and Boone M. Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;**300**:H2005-15.
46. Pisteia A, Bakker EN, Spaan JA and VanBavel E. Flow inhibits inward remodeling in cannulated porcine small coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**289**:H2632-40.
47. Pournaras CJ, Rungger-Brändle E, Riva CE, Hardarson SH and Stefansson E. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 2008;**27**:284-330.
48. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE and Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;**323**:22-7.

49. Linder L, Kiowski W, Bühler FR and Lüscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation* 1990;**81**:1762-7.
50. Lee KE, Klein BE, Klein R and Knudtson MD. Familial aggregation of retinal vessel caliber in the beaver dam eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;**45**:3929-33.
51. Taarnhøj NC, Larsen M, Sander B, Kyvik KO, Kessel L, Hougaard JL *et al.* Heritability of retinal vessel diameters and blood pressure: a twin study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;**47**:3539-44.
52. Xing C, Klein BE, Klein R, Jun G, Lee KE and Iyengar SK. Genome-wide linkage study of retinal vessel diameters in the Beaver Dam Eye Study. *Hypertension* 2006;**47**:797-802.
53. Khor CC, Fan Q, Goh LK, Wong TY, Li YJ, Cheung N *et al.* Hepatocyte growth factor and retinal arteriolar diameter in Singapore Chinese. *Ophthalmology* 2010;**117**:939-45.
54. Tanabe Y, Kawasaki R, Wang JJ, Wong TY, Mitchell P, Daimon M *et al.* Angiotensin-converting enzyme gene and retinal arteriolar narrowing: the Funagata Study. *J Hum Hypertens* 2009;**23**:788-93.
55. Liu YP, Kuznetsova T, Thijs L, Jin Y, Schmitz B, Brand SM *et al.* Are retinal microvascular phenotypes associated with the 1675G/A polymorphism in the angiotensin II type-2 receptor gene? *Am J Hypertens* 2011;**24**:1300-5.
56. Sun C, Wang JJ, Islam FM, Heckbert SR, Klein R, Siscovick DS *et al.* Hypertension genes and retinal vascular calibre: the Cardiovascular Health Study. *J Hum Hypertens* 2009;**23**:578-84.
57. Sun C, Tikellis G, Liew G, Klein R, Larsen EK and Wong TY. Apolipoprotein E gene and retinal microvascular signs in older people: the Cardiovascular Health Study. *Mol Vis* 2007;**13**:2105-11.

58. de Jong FJ, Ikram MK, Despriet DD, Uitterlinden AG, Hofman A, Breteler MM *et al.* Complement factor h polymorphism, inflammatory mediators, and retinal vessel diameters: the rotterdam study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;**48**:3014-8.
59. Donati G, Pournaras CJ, Munoz JL, Poitry S, Poitry-Yamate CL and Tsacopoulos M. Nitric oxide controls arteriolar tone in the retina of the miniature pig. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;**36**:2228-37.
60. Pereira TV, Rudnicki M, Cheung BM, Baum L, Yamada Y, Oliveira PS *et al.* Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *J Hypertens* 2007;**25**:1763-74.
61. Niu W and Qi Y. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. *PLoS One* 2011;**6**:e24266.
62. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE and Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2006;**164**:921-35.
63. Sandrim VC, Yugar-Toledo JC, Desta Z, Flockhart DA, Moreno H and Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are related to blood pressure elevation, but not to resistance to antihypertensive drug therapy. *J Hypertens* 2006;**24**:2393-7.
64. de Syllos RW, Sandrim VC, Lisboa HR, Tres GS and Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase genotype and haplotype are not associated with diabetic retinopathy in diabetes type 2 patients. *Nitric Oxide* 2006;**15**:417-22.
65. Yoon Y, Song J, Hong SH and Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem* 2000;**46**:1626-30.

66. Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallance P *et al.* Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension* 2001;**38**:1054-61.
67. Ritt M, Harazny JM, Ott C, Raff U, Schneider MP, Michelson G *et al.* Basal nitric oxide activity is an independent determinant of arteriolar structure in the human retinal circulation. *J Hypertens* 2011;**29**:123-9.
68. Jain SH, Massaro JM, Hoffmann U, Rosito GA, Vasan RS, Raji A *et al.* Cross-sectional associations between abdominal and thoracic adipose tissue compartments and adiponectin and resistin in the Framingham Heart Study. *Diabetes Care* 2009;**32**:903-8.
69. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M *et al.* Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J* 2004;**68**:975-81.
70. Wang Y, Xu LY, Lam KS, Lu G, Cooper GJ and Xu A. Proteomic characterization of human serum proteins associated with the fat-derived hormone adiponectin. *Proteomics* 2006;**6**:3862-70.
71. Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt C, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD and Palin MF. Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* 2010;**37**:11-32.
72. Tsubakio-Yamamoto K, Sugimoto T, Nishida M, Okano R, Monden Y, Kitazume-Taneike R *et al.* Serum adiponectin level is correlated with the size of HDL and LDL particles determined by high performance liquid chromatography. *Metabolism* 2012 [<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2012.05.011>]
73. Wilk S, Scheibenbogen C, Bauer S, Jenke A, Rother M, Guerreiro M *et al.* Adiponectin is a negative regulator of antigen-activated T cells. *Eur J Immunol* 2011;**41**:2323-32.
74. Zhang P, Wang Y, Fan Y, Tang Z and Wang N. Overexpression of adiponectin receptors potentiates the antiinflammatory action of subeffective dose of globular

- adiponectin in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;**29**:67-74.
75. Tabara Y, Osawa H, Kawamoto R, Tachibana-limori R, Yamamoto M, Nakura J *et al*. Reduced high-molecular-weight adiponectin and elevated high-sensitivity C-reactive protein are synergistic risk factors for metabolic syndrome in a large-scale middle-aged to elderly population: the Shimanami Health Promoting Program Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:715-22.
76. Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL and Garvey WT. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 2006;**55**:249-59.
77. Seino Y, Hirose H, Saito I and Itoh H. High-molecular-weight adiponectin is a predictor of progression to metabolic syndrome: a population-based 6-year follow-up study in Japanese men. *Metabolism* 2009;**58**:355-60.
78. Morrison JA, Glueck CJ, Daniels S, Wang P and Stroop D. Paradoxically high adiponectin in obese 16-year-old girls protects against appearance of the metabolic syndrome and its components seven years later. *J Pediatr* 2011;**158**:208-14.e1.
79. Li S, Shin HJ, Ding EL and van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009;**302**:179-88.
80. Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Ouchi N, Ohishi M, Sugimoto K *et al*. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension* 2004;**43**:1318-23.
81. Francischetti EA, Celoria BM, Duarte SF, da Silva EG, Santos IJ, Cabello PH *et al*. Hypoadiponectinemia is associated with blood pressure increase in obese insulin-resistant individuals. *Metabolism* 2007;**56**:1464-9.
82. Selcuk MT, Selcuk H, Temizhan A, Maden O, Saydam GS, Dogan M *et al*. Impact of plasma adiponectin levels to the presence and severity of coronary artery disease in patients with metabolic syndrome. *Coron Artery Dis* 2008;**19**:79-84.

83. Hitsumoto T, Takahashi M, Iizuka T and Shirai K. Relationship between metabolic syndrome and early stage coronary atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2007;**14**:294-302.
84. Bamberg F, Truong QA, Koenig W, Schlett CL, Nasir K, Butler J *et al.* Differential associations between blood biomarkers of inflammation, oxidation, and lipid metabolism with varying forms of coronary atherosclerotic plaque as quantified by coronary CT angiography. *Int J Cardiovasc Imaging* 2012;**28**:183-92.
85. Luc G, Empana JP, Morange P, Juhan-Vague I, Arveiler D, Ferrieres J *et al.* Adipocytokines and the risk of coronary heart disease in healthy middle aged men: the PRIME Study. *Int J Obes (Lond)* 2010;**34**:118-26.
86. Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Tchernova J, Cherry L, Wallace AM *et al.* Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Circulation* 2006;**114**:623-9.
87. Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, White CC, Cupples LA, Nakajima K *et al.* Adiponectin: an independent risk factor for coronary heart disease in men in the Framingham offspring Study. *Atherosclerosis* 2011;**217**:543-8.
88. Côté M, Cartier A, Reuwer AQ, Arsenault BJ, Lemieux I, Després JP *et al.* Adiponectin and risk of coronary heart disease in apparently healthy men and women (from the EPIC-Norfolk Prospective Population Study). *Am J Cardiol* 2011;**108**:367-73.
89. Koenig W, Khuseyinova N, Baumert J, Meisinger C and Löwel H. Serum concentrations of adiponectin and risk of type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease in apparently healthy middle-aged men: results from the 18-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *J Am Coll Cardiol* 2006;**48**:1369-77.

90. Laughlin GA, Barrett-Connor E, May S and Langenberg C. Association of adiponectin with coronary heart disease and mortality: the Rancho Bernardo study. *Am J Epidemiol* 2007;**165**:164-74.
91. Schulze MB, Shai I, Rimm EB, Li T, Rifai N and Hu FB. Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes* 2005;**54**:534-9.
92. Costacou T, Zgibor JC, Evans RW, Otvos J, Lopes-Virella MF, Tracy RP *et al*. The prospective association between adiponectin and coronary artery disease among individuals with type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia* 2005;**48**:41-8.
93. Frystyk J, Berne C, Berglund L, Jensevik K, Flyvbjerg A and Zethelius B. Serum adiponectin is a predictor of coronary heart disease: a population-based 10-year follow-up study in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:571-6.
94. Kizer JR, Barzilay JI, Kuller LH and Gottdiener JS. Adiponectin and risk of coronary heart disease in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:3357-64.
95. Kizer JR, Arnold AM, Strotmeyer ES, Ives DG, Cushman M, Ding J *et al*. Change in circulating adiponectin in advanced old age: determinants and impact on physical function and mortality. The Cardiovascular Health Study All Stars Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010;**65**:1208-14.
96. Araújo JP, Lourenço P, Rocha-Gonçalves F, Ferreira A and Bettencourt P. Adiponectin is increased in cardiac cachexia irrespective of body mass index. *Eur J Heart Fail* 2009;**11**:567-72.
97. Wolk R, Berger P, Lennon RJ, Brilakis ES, Davison DE and Somers VK. Association between plasma adiponectin levels and unstable coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007;**28**:292-8.

98. Pilz S, Mangge H, Wellnitz B, Seelhorst U, Winkelmann BR, Tiran B *et al.* Adiponectin and mortality in patients undergoing coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:4277-86.
99. Maiolino G, Cesari M, Sticchi D, Zanchetta M, Pedon L, Antezza K *et al.* Plasma adiponectin for prediction of cardiovascular events and mortality in high-risk patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;**93**:3333-40.
100. Hajer GR, van der Graaf Y, Olijhoek JK, Edlinger M and Visseren FL. Low plasma levels of adiponectin are associated with low risk for future cardiovascular events in patients with clinical evident vascular disease. *Am Heart J* 2007;**154**:750.e1-7.
101. Schnabel R, Messow CM, Lubos E, Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C *et al.* Association of adiponectin with adverse outcome in coronary artery disease patients: results from the AtheroGene study. *Eur Heart J* 2008;**29**:649-57.
102. Wilson SR, Sabatine MS, Wiviott SD, Ray KK, De Lemos JA, Zhou S *et al.* Assessment of adiponectin and the risk of recurrent cardiovascular events in patients presenting with an acute coronary syndrome: observations from the Pravastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Trial-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22). *Am Heart J* 2011;**161**:1147-55.e1.
103. Hung WC, Wang CP, Lu LF, Yu TH, Chiu CA, Chung FM *et al.* Circulating adiponectin level is associated with major adverse cardiovascular events in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Endocr J* 2010;**57**:793-802.
104. Kistorp C, Faber J, Galatius S, Gustafsson F, Frystyk J, Flyvbjerg A *et al.* Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005;**112**:1756-62.
105. Tsutamoto T, Tanaka T, Sakai H, Ishikawa C, Fujii M, Yamamoto T *et al.* Total and high molecular weight adiponectin, haemodynamics, and mortality in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2007;**28**:1723-30.

106. Wannamethee SG, Whincup PH, Lennon L and Sattar N. Circulating adiponectin levels and mortality in elderly men with and without cardiovascular disease and heart failure. *Arch Intern Med* 2007;**167**:1510-7.
107. Matsumoto M, Lee-Kawabata M, Tsujino T, Naito Y, Ezumi A, Sakoda T *et al.* Decrease in serum adiponectin levels in response to treatment predicts good prognosis in acute decompensated heart failure. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2010;**12**:900-4.
108. Biolo A, Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sonoda M, Walsh K *et al.* Determinants of adiponectin levels in patients with chronic systolic heart failure. *Am J Cardiol* 2010;**105**:1147-52.
109. Van Berendoncks AM, Garnier A, Beckers P, Hoymans VY, Possemiers N, Fortin D *et al.* Functional adiponectin resistance at the level of the skeletal muscle in mild to moderate chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 2010;**3**:185-94.
110. Tsioufis C, Dimitriadis K, Selima M, Thomopoulos C, Mihas C, Skiadas I *et al.* Low-grade inflammation and hypoadiponectinaemia have an additive detrimental effect on aortic stiffness in essential hypertensive patients. *Eur Heart J* 2007;**28**:1162-9.
111. Youn JC, Kim C, Park S, Lee SH, Kang SM, Choi D *et al.* Adiponectin and progression of arterial stiffness in hypertensive patients. *Int J Cardiol* 2011. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.06.061>]
112. Yilmaz MI, Sonmez A, Kilic S, Celik T, Bingol N, Pinar M *et al.* The association of plasma adiponectin levels with hypertensive retinopathy. *Eur J Endocrinol* 2005;**152**:233-40.
113. Higuchi A, Ohashi K, Kihara S, Walsh K and Ouchi N. Adiponectin suppresses pathological microvessel formation in retina through modulation of tumor necrosis factor-alpha expression. *Circ Res* 2009;**104**:1058-65.

114. Higuchi A, Ohashi K, Shibata R, Sono-Romanelli S, Walsh K and Ouchi N. Thiazolidinediones reduce pathological neovascularization in ischemic retina via an adiponectin-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;**30**:46-53.
115. Yano Y, Hoshida S, Ishikawa J, Hashimoto T, Eguchi K, Shimada K *et al.* Differential impacts of adiponectin on low-grade albuminuria between obese and nonobese persons without diabetes. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2007;**9**:775-82.
116. Looker HC, Krakoff J, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tanaka S, Nelson RG *et al.* Adiponectin concentrations are influenced by renal function and diabetes duration in Pima Indians with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;**89**:4010-7.
117. Menon V, Li L, Wang X, Greene T, Balakrishnan V, Madero M *et al.* Adiponectin and mortality in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;**17**:2599-606.
118. Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR *et al.* Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 2008;**118**:1645-56.
119. Essick EE, Ouchi N, Wilson RM, Ohashi K, Ghobrial J, Shibata R *et al.* Adiponectin mediates cardioprotection in oxidative stress-induced cardiac myocyte remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;**301**:H984-93.
120. Liao Y, Takashima S, Maeda N, Ouchi N, Komamura K, Shimomura I *et al.* Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism. *Cardiovasc Res.* 2005;**67**:705-13.
121. Amin RH, Mathews ST, Alli A and Leff T. Endogenously produced adiponectin protects cardiomyocytes from hypertrophy by a PPAR γ -dependent autocrine mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;**299**:H690-8.
122. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y *et al.* Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-

binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 2002;**105**:2893-8.

5. Objetivos

5.1 – Objetivos gerais

O presente estudo teve por objetivo desenvolver modelos integrados de etiopatogenia das alterações microvasculares, avaliadas por calibre vascular, compostos por fatores de risco cardiovascular advindos da base epidemiológica, mecanismos moleculares oriundos de modelos experimentais, e sua translação na patogênese de doença cardiovascular em seres humanos.

5.2 – Objetivos específicos

5.2.1 – Avaliar a relação entre exposições, em diferentes níveis de complexidade, com alterações vasculares na retina, identificadas por análise semiautomática de retinografias digitais, utilizando software desenvolvido pelo grupo de Hipertensão, em indivíduos hipertensos.

Foram analisadas as associações de anormalidades de retina – estreitamento arteriolar, razão arteríolo-venular, diâmetro de arteríolas e vênulas – com:

- Sexo, cor da pele e idade;
- Escolaridade;

- Tabagismo;
- Obesidade (índice de massa corporal);
- Circunferência da cintura;
- Dislipidemia;
- Diabetes mellitus;
- Hemoglobina glicada;
- Proteína C reativa;
- Genótipo para o polimorfismo G894T do gene NOS3;
- Adiponectina.

5.2.2 – Caracterizar a interação desses mecanismos e sua associação com anormalidades retinianas, construindo um modelo para estudo do polimorfismo do gene NOS3 e outro para adiponectina plasmática.

6. Artigo 1

NOS3 G894T polymorphism and retinal vessel caliber in hypertension

MB MOREIRA^{a,b}, FD FUCHS^{a,b}, SC FUCHS^{a,b} on behalf of co-investigators

^a Postgraduate Studies Program in Cardiology, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Ramiro Barcelos 2600, 2º. andar, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Division of Cardiology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and the National Institute for Science and Technology for Health Technology Assessment (IATS/CNPq), R. Ramiro Barcelos 2350, Centro de Pesquisa Clínica, 5º. andar, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

BACKGROUND: Genetic inheritance is a major determinant of retinal vessel calibers, although most of the culprit polymorphisms remain to be identified. The G894T SNP of the NOS3 gene is associated with hypertension and other cardiovascular diseases. In the present study we investigated the association of this polymorphism with retinal vessel caliber among hypertensive individuals.

METHODS: Subjects aged 18 years or more with previous diagnosis of hypertension were evaluated. Data on office and 24-h ambulatory blood pressure, past medical history, use of drug therapy, laboratory evaluation, and NOS3 genotype were collected. Vessel calibers were measured through microdensitometric analysis of fundus photographs.

RESULTS: Comparing GG vs. TT/TG groups, mean arteriolar caliber was 107.1 ± 10.5 (n=85) vs. 106.8 ± 9.4 (n=84; P=0.98) and mean venular caliber was 129.2 ± 13.8 (n=89) vs. 129.6 ± 14.9 (n=84; P=0.95). Independent predictors of arteriolar caliber were HbA1c ($\beta=-0.224$; P=0.004), total cholesterol ($\beta=-0.195$; P=0.014), and the fellow vessel. Body mass index ($\beta=0.181$; P=0.02), smoking ($\beta=0.170$; P=0.03), and fellow vessel were independent predictors of venular caliber. The TT/TG genotype remained not associated with either arteriolar or venular calibers in the multivariable model.

CONCLUSION: G894T polymorphism is not associated with retinal vessel caliber among patients with hypertension.

Keywords: NOS3, G894T, polymorphism, hypertension, retina, caliber

Background

Retinal microvascular abnormalities are to some extent attributable to sustained high blood pressure (1), and a reduction in arteriolo-venular ratio may precede the diagnosis of hypertension (2). Narrower arterioles and wider venules are also predictors of cardiovascular events (3, 4).

Genetic inheritance is a major determinant of retinal vessel caliber (5, 6) and genome-wide association studies (GWAS) were able to identify the loci related to arteriolar and venular calibers (6, 7). Although many genes related to nitric oxide (NO) synthesis pathway were implicated, the NOS3 gene – which encodes one of the main enzymes for vascular tonus regulation (8, 9) – was not significantly linked to the phenotype, neither were other candidate genes for cardiovascular disease, which have already been associated to retinal vessel caliber (10, 11).

The association between polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase (NOS) gene (NOS3) and cardiovascular disease is well established in some populations (12-16), even though there is controversy on if the G894T (Glu298Asp) SNP causes reduced NO synthesis *in vivo* (17, 18). Carriers of T allele in Asian populations presented increased risk of hypertension (19) and of coronary heart disease (CHD) (20). In a study conducted in Brazil, the haplotype that included the T allele was associated with blood pressure elevation (21) and with reduced NO production in individuals with normal blood pressure (22).

Considering the importance of NO in vascular regulation and the potential involvement of NOS3 polymorphisms in hypertension and CHD susceptibility (20), the

present study aimed to investigate the association of the NOS3 G894T SNP and retinal vessel caliber among hypertensive individuals.

Methods

Participants

This cross-sectional study included individuals aged 18 years or older with previous diagnosis of hypertension, who were referred to tertiary care, who were screened to participate in a randomized clinical trial. Participants were excluded if they presented secondary hypertension, chronic renal failure on replacement therapy, acute coronary syndrome or stroke in the previous six months and chronic heart failure class III or IV of the New York Heart Association. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (number: 09-487), certified by the *Office of Human Research Protections*, and all participants provided a written informed consent.

Studied variables

Socio-demographic characteristics, past medical history, pharmacological treatment, and smoking status (current or past vs. never) were assessed by trained interviewers. Weight (kg) and height (m) measurements were made in duplicate and the average was used to calculate body mass index (BMI, in kg/m^2). Peripheral venous blood sample were obtained after 12h fasting for analysis of plasma glucose, glycosylated hemoglobin (HbA1c), ultra sensitive C reactive protein (CRP), serum creatinine and lipid profile. Diagnosis of diabetes mellitus was established by fasting plasma glucose ≥ 126 mg/dl, HbA1c $\geq 6.5\%$, or use of anti-diabetic drug treatment.

Hypertension was reported at the interview, and confirmed by office systolic blood pressure (SBP) ≥ 140 mmHg, office diastolic blood pressure (DBP) ≥ 90 mmHg, or use of antihypertensive drugs. Office blood pressure (23) was measured with a validated automated device (OMRON HEM-705 CP; OMRON, Matsuzaka, Mie, Japan) and the mean of four measurements was employed in the analyses. Daytime, night-time and 24h SBP and DBP were recorded using ambulatory blood pressure monitoring with validated device (Spacelabs 90207, Spacelabs, Redmond, WA), performed every 15 minutes during the day and every 20 minutes at night, with a cuff size appropriate for the brachial circumference.

Genotyping

Peripheral venous blood sample was taken in the day of study interview, between 2006 and 2008, and 2 ml of whole blood were stored at -80°C until 2010. DNA from peripheral leucocytes was extracted with a commercial kit with silica membrane (DNeasy® Blood & Tissue Kit, QIAGEN, Germantown, MD) and stored at -80°C . Genotyping was performed in 2011 through TaqMan® SNP Genotyping system, with pre-designed sequences (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Retinal vessel caliber assessment

The semi-automated microdensitometric method used for retinography analysis was previously described in details (24). In summary, 35° optic fundus colored photographs were taken under pharmacological mydriasis, and digitized. Trained graders, blinded to participant characteristics and genotype, identified arterioles and venules in an area between 1.5 and 2.0 optic disk diameter from disk border. Vessel limits were automatically determined and caliber was estimated by the mean distance of parallel vessel wall points. A calibration factor was used for converting pixels to

micrometers. This method presents good reproducibility; the intra-observer intraclass correlation coefficient (ICC) was 0.98 for both arterioles and venules and inter-observer ICC was 0.95 for arterioles and 0.98 for venules (24).

Statistical analysis

Characteristics associated with retinal vessel calibers were investigated using a dominant model of inheritance for the T allele, as described in previous studies (19, 20). Sample characteristics according to genotype were analyzed by Student t-test for independent samples, Mann-Whitney U, or Chi-square test. Univariate analysis for the association between genotype and retinal vessel calibers were performed with U test and Spearman correlation coefficient (ρ) due to heterocedasticity. Multivariate model was developed through hierarchical approach in order to control for confounding factors (25), and analysis was conducted using multiple linear regression. Genotype, age, sex, total cholesterol (19), and the fellow vessel were forced into the model, together with variables with a trend for association ($P < 0.2$) in the univariate analysis. Blood pressure was not included in the final model, since it could be an intermediate variable in the association between NOS3 genotype and vessel calibers. In order to detect a difference between groups of 5 μm for arterioles and 6 μm for venules with U test, assuming underlying normal distribution, the statistical power was, respectively, 88% and 80%, considering that mean arteriolar and venular caliber and the respective standard deviations were 105.1 ± 10.2 and 129.5 ± 13.6 for the whole sample. Hardy-Weinberg equilibrium was verified with chi-square test, and linkage disequilibrium would be considered if $P < 0.05$.

Results

Among 216 participants whose DNA was analyzed, 109 (50.5%) were homozygous for G allele, 86 (39.8%) were heterozygous, and 21 (9.7%) were homozygous for the T allele. Observed genotype distribution was as expected, according to Hardy-Weinberg equilibrium ($P=0.5$). Among the 216 participants, 169 had information on mean arteriolar and 173 on mean venular calibers. Causes for missing data were poor image quality, technical impossibility of caliber assessment ($n=6$ for arterioles and $n=2$ for venules), or retinography not performed ($n=41$).

Table 1 presents the description of the sample according to the genotype. There was a trend toward association of genotype with skin color – T allele was more frequent in whites, and with total cholesterol, which was lower in TT/TG group. However, no association between NOS3 genotype and vascular caliber was identified. Mean arteriolar caliber in GG group ($n=85$) was 107.1 ± 10.5 vs. 106.8 ± 9.4 in TT/TG group ($n=84$; $P=0.98$). For venules, mean caliber in the first group ($n=89$) was 129.2 ± 13.8 vs. 129.6 ± 14.9 , in the second ($n=84$; $P=0.95$).

Table 2 shows characteristics associated with retinal vessel calibers. Arterioles were significantly wider in men than in women, and they were narrower in diabetic than non-diabetic individuals. No differences were observed in venular caliber, although there was a trend for wider venules among current or past smokers in comparison to individuals who never smoked.

Correlation coefficients for variables in study and retinal vessel caliber are presented in Table 3. Office SBP and DBP showed a trend toward an inverse correlation with arteriolar caliber. HbA1c and C-reactive protein were inversely correlated with arteriolar caliber. There was a trend toward a negative correlation between total

cholesterol and arteriolar caliber, but positive with serum creatinine. No statistically significant correlations with venular caliber were identified, but there were trends toward associations with BMI and creatinine, both direct, but inverse for HDL cholesterol.

Table 4 shows the multivariate model for variables associated with arteriole caliber, which included age, sex, HbA1c, total cholesterol, C-reactive protein, NOS3 genotype, and the fellow vessel (venular caliber). The NOS3 genotype was not associated with arteriole caliber, but HbA1c and total cholesterol were independent predictors, and C-reactive protein presented a borderline statistical significance. The fellow vessel was the strongest predictor. The multivariate model for venular caliber included age, BMI, smoking status, total cholesterol, NOS3 genotype, and fellow vessel (arteriolar caliber). Body mass index and smoking status were directly and independently associated with venular caliber, while NOS3 genotype was not associated. No other significant associations were identified, besides the fellow vessel. Creatinine was not included in the final models since there was marked collinearity.

Discussion

This study demonstrated that NOS3 G894T SNP was not associated with retinal vessel calibers among hypertensive individuals. Other metabolic markers – HbA1c and total cholesterol – were inversely and independently associated with arteriolar caliber, while BMI and smoking were independent predictors of wider venular caliber.

GWAS conducted in an American population sample (7) showed the association between retinal vessel caliber and SNPs of genes related to NO synthesis pathway, although NOS3 had not been pointed out as a candidate gene. A study performed in Singapore (26) has confirmed the association of the HGF gene, which was identified through the GWAS and is thought to participate in NO synthesis, with arteriolar caliber, reinforcing the importance of this pathway in vessel caliber determination.

Evidence from experimental models suggested that NO is an important vascular regulator in retina, where it is produced ubiquitously (27). Ganglionic cells, horizontal cells, photoreceptors, and Müller's cells produce NO through neuronal nitric oxide synthase (encoded by NOS1). Retinal and choroidal endothelial cells and capillary pericytes produce NO through endothelial NOS (encoded by NOS3) (28). Polymorphisms in the latter gene, besides potentially altering NO synthesis *in vivo* (17), have been associated with hypertension (19, 20) and CHD (20).

The evaluation of retinal vessels is an opportunity to study systemic microvascular remodeling that follows hypertension in human beings, *in vivo* (29). Experimental evidence suggests that an impaired NO production or bioavailability may participate in early phases of inward eutrophic remodeling, commonly found in individuals with essential hypertension (30). Although the microdensitometric method is unable to measure wall thickness, it is able to detect lumen narrowing (31). However, this study did not provide evidence of an influence of the G894T polymorphism on arteriolar or venular caliber.

Investigations of candidate genes polymorphisms as genetic determinants of retinal vessel caliber have identified the ACE (10) and the ATR2 (11) genes as potentially implicated. Nonetheless, investigations of other candidates genes, such as ADD1,

ADRB2, GNB3 (32) APOE (33) and CFH (34), showed negative associations. Once more, a genetic polymorphisms supposedly related to cardiovascular abnormalities has failed to predict retinal vessel caliber.

The absence of association between GENES and retinal vessels calibers may be at least in part explained. There are several other mechanisms of vasomotor regulation in the retina that are independent of the endothelial NOS, such as NO production through neuronal NOS and metabolic regulation through lactate and adenosine (28), which may have a compensatory effect. Furthermore, we investigated only the dominant inheritance model, but other studies report a recessive pattern for the T allele (12). The expressive number of comparisons needed and the small proportion homozigous individuals for T alele raise the concern of random error and discourage such analysis. Also, the sample restricted to hypertensive individuals may be contributing to the negative result. Essential hypertension is a polygenic disease (35), and other genes, or even other NOS3 polymorphisms, may be playing an important role in vascular caliber determination. Furthermore, small sample size has not allowed subgroup analysis according to pharmacological treatment, what would be desirable considering the potential pharmacogenetic implications of the G894T polymorphism (36).

To date, we are not aware of previous studies of retinal vessel caliber and the G849T SNP of the NOS3 gene. Among the strengths of our study are the method employed for retinal vessel caliber assessment, which has good reproducibility, and a focus based on the previous physiopathological knowledge, reducing the number of comparisons and chance for spurious findings.

Conclusion

G849T SNP of the NOS3 gene is not associated with arteriolar and venular calibers measured through automatic retinography analysis. Studies including larger sample size and other populations are needed to improve the understanding of the role of NOS3 polymorphisms on retinal vessel caliber.

References

1. Sharrett AR, Hubbard LD, Cooper LS, Sorlie PD, Brothers RJ, Nieto FJ et al. Retinal arteriolar diameters and elevated blood pressure: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1999;**150**:263-70.
2. Wong TY, Shankar A, Klein R, Klein BE and Hubbard LD. Prospective cohort study of retinal vessel diameters and risk of hypertension. *BMJ* 2004;**329**:79.
3. McGeechan K, Liew G, Macaskill P, Irwig L, Klein R, Klein BE et al. Meta-analysis: retinal vessel caliber and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 2009;**151**:404-13.
4. McGeechan K, Liew G, Macaskill P, Irwig L, Klein R, Klein BE et al. Prediction of incident stroke events based on retinal vessel caliber: a systematic review and individual-participant meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2009;**170**:1323-32.
5. Lee KE, Klein BE, Klein R and Knudtson MD. Familial aggregation of retinal vessel caliber in the beaver dam eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;**45**:3929-33.
6. Sun C, Zhu G, Wong TY, Hewitt AW, Ruddle JB, Hodgson L et al. Quantitative genetic analysis of the retinal vascular caliber: the Australian Twins Eye Study. *Hypertension* 2009;**54**:788-95.
7. Xing C, Klein BE, Klein R, Jun G, Lee KE and Iyengar SK. Genome-wide linkage study of retinal vessel diameters in the Beaver Dam Eye Study. *Hypertension* 2006;**47**:797-802.
8. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;**100**:2153-7.
9. Andrew PJ and Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999;**43**:521-31.
10. Tanabe Y, Kawasaki R, Wang JJ, Wong TY, Mitchell P, Daimon M et al. Angiotensin-converting enzyme gene and retinal arteriolar narrowing: the Funagata Study. *J Hum Hypertens* 2009;**23**:788-93.

11. Liu YP, Kuznetsova T, Thijs L, Jin Y, Schmitz B, Brand SM *et al.* Are retinal microvascular phenotypes associated with the 1675G/A polymorphism in the angiotensin II type-2 receptor gene? *Am J Hypertens* 2011;**24**:1300-5.
12. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;**32**:521-6.
13. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H *et al.* Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998;**31**:1506-10.
14. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A *et al.* A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 1999;**100**:1515-20.
15. Mitchell GF, Guo CY, Kathiresan S, Vasan RS, Larson MG, Vita JA *et al.* Vascular stiffness and genetic variation at the endothelial nitric oxide synthase locus: the Framingham Heart study. *Hypertension* 2007;**49**:1285-90.
16. Lembo G, De Luca N, Battagli C, Iovino G, Aretini A, Musicco M *et al.* A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke* 2001;**32**:735-40.
17. Yoon Y, Song J, Hong SH and Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem* 2000;**46**:1626-30.
18. Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallance P *et al.* Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension* 2001;**38**:1054-61.
19. Pereira TV, Rudnicki M, Cheung BM, Baum L, Yamada Y, Oliveira PS *et al.* Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and

- normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *J Hypertens* 2007;**25**:1763-74.
20. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE and Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2006;**164**:921-35.
21. Sandrim VC, Yugar-Toledo JC, Desta Z, Flockhart DA, Moreno H and Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are related to blood pressure elevation, but not to resistance to antihypertensive drug therapy. *J Hypertens* 2006;**24**:2393-7.
22. Sandrim VC, de Syllos RW, Lisboa HR, Tres GS and Tanus-Santos JE. Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. *Nitric Oxide* 2007;**16**:348-55.
23. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL *et al.* The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003;**289**:2560-72.
24. Pakter HM, Ferlin E, Fuchs SC, Maestri MK, Moraes RS, Nunes G *et al.* Measuring arteriolar-to-venous ratio in retinal photography of patients with hypertension: development and application of a new semi-automated method. *Am J Hypertens* 2005;**18**:417-21.
25. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC and Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol* 1997;**26**:224-7.
26. Khor CC, Fan Q, Goh LK, Wong TY, Li YJ, Cheung N *et al.* Hepatocyte growth factor and retinal arteriolar diameter in Singapore Chinese. *Ophthalmology* 2010;**117**:939-45.
27. Donati G, Pournaras CJ, Munoz JL, Poitry S, Poitry-Yamate CL and Tsacopoulos M. Nitric oxide controls arteriolar tone in the retina of the miniature pig. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;**36**:2228-37.

28. Pournaras CJ, Rungger-Brändle E, Riva CE, Hardarson SH and Stefansson E. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 2008;**27**:284-330.
29. Rizzoni D, Porteri E, Duse S, De Ciuceis C, Rosei CA, La Boria E *et al.* Relationship between media-to-lumen ratio of subcutaneous small arteries and wall-to-lumen ratio of retinal arterioles evaluated noninvasively by scanning laser Doppler flowmetry. *J Hypertens* 2012;**30**:1169-75.
30. Pisteia A, Bakker EN, Spaan JA and VanBavel E. Flow inhibits inward remodeling in cannulated porcine small coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**289**:H2632-40.
31. Pakter HM, Fuchs SC, Maestri MK, Moreira LB, Dei Ricardi LM, Pamplona VF *et al.* Computer-assisted methods to evaluate retinal vascular caliber: what are they measuring? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;**52**:810-5.
32. Sun C, Wang JJ, Islam FM, Heckbert SR, Klein R, Siscovick DS *et al.* Hypertension genes and retinal vascular calibre: the Cardiovascular Health Study. *J Hum Hypertens* 2009;**23**:578-84.
33. Sun C, Tikellis G, Liew G, Klein R, Larsen EK and Wong TY. Apolipoprotein E gene and retinal microvascular signs in older people: the Cardiovascular Health Study. *Mol Vis* 2007;**13**:2105–11.
34. de Jong FJ, Ikram MK, Despret DD, Uitterlinden AG, Hofman A, Breteler MM *et al.* Complement factor h polymorphism, inflammatory mediators, and retinal vessel diameters: the rotterdam study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;**48**:3014-8.
35. Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L *et al.* Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet* 2009;**41**:666-76.
36. Turner ST, Chapman AB, Schwartz GL and Boerwinkle E. Effects of endothelial nitric oxide synthase, alpha-adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide. *Am J Hypertens* 2003;**16**:834–9.

Table 1. Sample characteristics according to NOS3 genotype [mean \pm SD or n (%)]

Characteristics	GG (N=109)	TT/TG (N=107)	P
Men	46 (42.2)	39 (36.4)	0.4
Age (years)	60.0 \pm 11.0	60.5 \pm 11.4	0.8
Non-white	34 (31.2)	21 (19.6)	0.05
Current/past smoker	47 (43.9)	46 (44.2)	1.0
Body mass index (kg/m ²)	29.8 \pm 5.1	30.4 \pm 5.0	0.4
Office SBP (mmHg)	152.3 \pm 20.9	150.1 \pm 19.5	0.4
Office DBP (mmHg)	87.0 \pm 12.4	85.4 \pm 11.1	0.3
24h-SBP (mmHg)	132.7 \pm 17.3	134.4 \pm 16.0	0.5
24h-DBP (mmHg)	77.9 \pm 12.3	78.5 \pm 11.0	0.7
Daytime SBP (mmHg)	136.2 \pm 16.5	138.1 \pm 16.3	0.4
Daytime DBP (mmHg)	81.2 \pm 12.7	81.9 \pm 11.4	0.7
Night-time SBP (mmHg)	126.0 \pm 20.7	127.0 \pm 17.6	0.7
Night-time DBP (mmHg)	71.3 \pm 13.0	71.4 \pm 11.7	0.9
Diabetes	47 (43.1)	48 (44.9)	0.8
HbA1c (%)	6.74 \pm 1.46	6.59 \pm 1.07	0.4
HDL cholesterol (mg/dl)	47.7 \pm 11.7	48.9 \pm 14.7	0.5
Total cholesterol (mg/dl)	206.4 \pm 45.4	197.5 \pm 36.5	0.15
Triglycerides (mg/dl) ¹	152.0 (105.5-212.5)	133.5 (101.5-192.0)	0.4
Creatinine (mg/dl)	0.98 \pm 0.25	0.95 \pm 0.25	0.4
C-reactive protein (mg/dl) ¹	2.65 (1.5-4.7)	3.2 (1.85-5.2)	0.2
Anti-hypertensive drugs			
Thiazide diuretics	61 (56.0)	67 (62.6)	0.3
ACE inhibitors	72 (66.1)	72 (67.3)	0.8
ARB	5 (4.6)	5 (4.7)	1.0
Beta-Blocker	50 (45.9)	53 (49.5)	0.6
Calcium Channel Blocker	28 (25.7)	31 (29.0)	0.6

¹median (interquartile range); SBP:systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; ARB: angiotensin receptor blockers

Table 2. Characteristics associated with retinal vessel calibers (mean \pm SD)¹

Characteristics	Arteriolar caliber (n=169)	P ¹	Venular caliber (n=173)	P ¹
Sex		0.049		0.3
Men	108.01 \pm 9.0		131.6 \pm 17.0	
Women	106.2 \pm 10.4		128.0 \pm 12.3	
Skin color		0.6		0.2
White	107.3 \pm 10.4		128.6 \pm 14.5	
Non-white	105.9 \pm 8.8		131.3 \pm 14.0	
Smoking		0.3		0.13
Current/past smoker	106.1 \pm 8.8		130.7 \pm 12.7	
Never smoked	107.8 \pm 10.8		127.7 \pm 14.5	
Diabetes		0.04		0.7
Yes	104.8 \pm 7.7		130.0 \pm 15.8	
No	108.6 \pm 11.2		128.9 \pm 13.1	

¹Mann-Whitney U test

Table 3. Correlation between retinal vessel calibers and studied variables¹

Characteristics	Arteriolar caliber (n=169)		Venular caliber (n=173)	
	P	P	ρ	P
Age (years)	0.070	0.4	0.028	0.7
Office SBP (mmHg)	-0.166	0.13	0.027	0.7
Office DBP (mmHg)	-0.119	0.12	0.010	0.9
24h-SBP (mmHg)	-0.068	0.4	0.013	0.9
24h-DBP (mmHg)	-0.011	0.9	0.057	0.5
Daytime SBP (mmHg)	-0.051	0.5	0.031	0.7
Daytime DBP (mmHg)	0.006	0.9	0.072	0.4
Night-time SBP (mmHg)	-0.090	0.2	-0.039	0.6
Night-time DBP (mmHg)	0.028	0.7	0.007	0.9
Body mass index (kg/m ²)	-0.055	0.5	0.098	0.19
HbA1c (%)	-0.187	0.02	0.015	0.8
HDL cholesterol (mg/dl)	-0.078	0.3	-0.148	0.06
Total cholesterol (mg/dl)	-0.148	0.08	-0.073	0.4
Triglycerides (mg/dl)	0.037	0.6	0.050	0.5
Creatinine (mg/dl)	0.125	0.12	0.119	0.14
C-reactive protein (mg/dl)	-0.181	0.02	0.032	0.7

¹Spearman correlation coefficient

SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure

Table 4. Multiple linear regression model of retinal vessels determinants in hypertensive patients

Characteristics	Adjusted β^*	P
Arteriole caliber (μm)		
Age (years)	0.028	0.7
Sex (male)	-0.023	0.8
HbA1c (%)	-0.224	0.004
Total cholesterol (mg/dL)	-0.195	0.014
C-reactive protein (mg/dL)	-0.156	0.052
NOS3 genotype – TT/GT	0.017	0.8
Venular caliber (μm)	0.375	<0.001
Model	$R^2=0.260$	<0.001
Venular caliber (μm)		
Age (years)	0.112	0.2
Body mass index (kg/m^2)	0.181	0.02
Smoking (current/past vs. never)	0.170	0.03
Total cholesterol (mg/dL)	0.071	0.4
NOS3 genotype – TT/GT	0.034	0.7
Arteriolar caliber (μm)	0.439	<0.001
Model	$R^2=0.227$	<0.001

*Adjusted for all variables presented in the table separately for arteriolas and venular calibers

7. Artigo 2

Plasma adiponectin and retinal vessels caliber evaluated by a microdensitometric method: evidence of an inverse association in older patients with hypertension

MB MOREIRA^{a,b}, FD FUCHS^{a,b}, SC FUCHS^{a,b} on behalf of co-investigators

^a Postgraduate Studies Program in Cardiology, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, R. Ramiro Barcelos 2600, 2^o. andar, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Division of Cardiology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and the National Institute for Science and Technology for Health Technology Assessment (IATS/CNPq), R. Ramiro Barcelos 2350, Centro de Pesquisa Clínica, 5^o. andar, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

BACKGROUND: Adiponectin is believed to be protective against macrovascular disease, but it is predictive of adverse outcomes in high-risk patients as well. The relationship of adiponectin and microvascular abnormalities among hypertensive individuals is unknown. This study aimed to assess the association between plasma adiponectin and retinal vessel calibers in this population.

METHODS: This cross-sectional study included 172 participants, aged 18 to 80 years, referred to the hypertension outpatient clinic of a university-affiliated hospital. Subjects with recent cardiovascular events, advanced heart failure and end-stage renal disease were excluded. Clinical and demographic data and blood pressure were assessed. Adiponectin was quantified with ELISA. Arteriolar and venular calibers were measured in retinographies with a microdensitometric method.

RESULTS: Among individuals with adiponectin below the median, mean age was 58.3 ± 11.3 years and 61.2 ± 10.8 years for those above ($P=0.09$). The first group had greater waist circumference (102.0 ± 10.0 vs. 98.6 ± 11.8 cm; $P=0.04$), higher HbA1c (6.8 ± 1.4 vs. $6.4 \pm 0.8\%$, $P=0.008$), higher prevalence of diabetes (50.0 vs. 33.7% , $P=0.03$), and lower HDL cholesterol (45.7 ± 10.9 vs. 50.7 ± 14.0 mg/dl, $P=0.01$). Arteriolar caliber was directly correlated with age, but inversely with HbA1c. In multivariate analysis, adiponectin ($\beta = -0.260$, $P=0.004$), HbA1c ($\beta = -0.293$, $P=0.001$) and office diastolic blood pressure ($\beta = -0.176$, $P=0.047$) were inversely associated with arteriolar caliber exclusively among older participants.

CONCLUSIONS: Adiponectin is inversely associated with retinal arteriolar caliber in older hypertensive subjects, suggesting that adiponectin is a marker of microvascular damage and of higher cardiovascular risk in this age stratum.

Keywords: adiponectin, retina, vessels, hypertension, microcirculation

Background

Adiponectin, an adipose tissue-derived hormone, increases insulin sensitivity in various tissues and modulates inflammatory processes, among other effects (1). In cohort studies conducted in the general population, individuals with higher plasma adiponectin concentrations had a lower risk of coronary artery disease (CAD) (2). Paradoxically, after an episode of acute coronary syndrome, higher adiponectin levels were associated with an increased incidence of myocardial infarction or death during follow-up (3). Hence, although adiponectin seems to be an anti-atherosclerotic hormone, its pathophysiologic role and prognostic significance are still not well established.

Some authors have considered adiponectin as a molecular marker of hypertension (4), but only a limited number of studies evaluated the relationship between adiponectin and cardiovascular prognosis in individuals with hypertension (5, 6, 8). Furthermore, regarding macrovascular events, only surrogate endpoints were investigated in patients with hypertension. Low circulating adiponectin levels were associated with a reduction in carotid-femoral pulse wave velocity (5, 6) – partially explaining the association between arterial stiffness and visceral obesity (7) – and with increased risk of arterial stiffness progression (8) among individuals with hypertension. These findings are in accordance with the concept that adiponectin is a protective hormone against atherosclerosis and arteriosclerosis.

The association between microvascular damage and reduction in circulating adiponectin was also suggested, since low plasma levels were found among individuals with severe hypertensive retinopathy (9), diagnosed by indirect and direct ophthalmoscopy.

In the past decade, innovations in retinography image analysis such as the microdensitometric method have improved the accuracy in the detection of arteriolar and venular calibers, with better reproducibility than direct ophthalmoscopy (10). Retinography analysis offers a direct, in vivo visualization of microvascular pathological processes that occur systemically in hypertensive individuals (11). Moreover, evaluation of retinal vessels caliber in large population-based epidemiologic studies showed that narrower arterioles and wider venules were associated with worse cardiovascular diagnosis (12, 13). The aim of the present study was to evaluate the association between plasma adiponectin and retinal arteriolar and venular calibers among patients with hypertension.

Methods

This cross sectional study enrolled subjects aged 18 to 80 years with previous diagnosis of hypertension, evaluated at a tertiary care university-affiliated hospital during the screening for a randomized clinical trial (14). We excluded subjects with history of acute coronary syndrome or stroke in the six months previous to study entry, heart failure New York Heart Association functional classification III or IV, end-stage renal disease on dialysis or clinical evidence of secondary hypertension. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (number: 09-487), certified by the Office of Human Research Protections, and all participants gave written informed consent.

Socio-demographic characteristics, past medical history, current drug therapy and tobacco use (in pack-years) were collected through a standardized interview. Weight (kg), height (m), and waist circumference (cm) were measured in duplicate, and body

mass index (BMI, kg/m²) was calculated. Diagnosis of diabetes was defined as fasting glucose \geq 126 mg/dl, glycated hemoglobin (HbA1c) \geq 6.5% or use of antidiabetic drugs.

Certified investigators performed data collection and standardized office blood pressure (BP) measurements (15) using a validated oscillometric device (OMRON HEM-705 CP; OMRON, Matsuzaka, Mie, Japan). Hypertension was diagnosed by systolic BP \geq 140 mmHg or diastolic BP \geq 90 mmHg (average of 4 measurements, in two visits) or use of antihypertensive drugs. Ambulatory blood pressure monitoring was carried out using a validated device (Spacelabs 90207, Spacelabs, Redmond, WA), with BP measured every 15 minutes between 07:00 and 23:00 h and every 20 minutes between 23:00 and 07:00 h (16). Twenty four hours systolic blood pressure (24h SBP) and diastolic blood pressure (24h DBP), daytime SBP and DBP, and night-time SBP and DBP were calculated and used in analysis.

Detailed description of retinography acquisition and analysis were provided elsewhere (17). Briefly, 35° color fundus photographs were taken after pharmacological mydriasis, and subsequently digitized. Trained and blinded graders identified vessels in an area corresponding to 1.5 to 2.0 optic disc diameters from disc edge. Mean vessel caliber was measured in pixels and converted to micrometers (μ m) by the software, according to the calibration factor. Intra-observer intraclass correlation coefficient (ICC) was 0.98 for arterioles and venules, while inter-observer ICC was 0.95 e 0.98 for arterioles and venules, respectively (17).

Total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, HbA1c, creatinine, and high-sensitivity C reactive protein (hs-CRP) were measured. Venous blood samples were collected after 12h fasting and stored in EDTA-treated tubes at -80 °C for adiponectin

measurement, held in a subsample of consecutive participants. Total adiponectin quantification was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturer's protocol [Adiponectin (Multimeric) ALPCO, USA].

Statistical Analysis

Univariate analyses were performed using Student's t test, Mann-Whitney U test, chi-square test or Spearman's correlation coefficient (ρ). Multiple linear regression models, using a hierarchical approach to control for confounding factors (18), were used. In brief, the conceptual framework assumed that demographic variables (distal determinants) may affect other intermediate confounding factors, but were not influenced by them (18). All variables with a trend for significance in the univariate analysis ($P < 0.2$) were included in the multivariate models, in addition to age and the fellow vessel, which were forced in the model. Gender was included only in the model with venular caliber as outcome. Because we found an interaction between adiponectin and age in the multivariate analysis, we stratified the sample by age (27 to 59 and 60 to 80 years of age), and run the multivariate models within each stratum.

Variables with non-normal distribution were log-transformed. Collinearity was evaluated through condition index values. To detect a $R^2 = 0.2$, assuming $\alpha = 0.05$ and 7 variables in the model, a sample size of 90 individuals would yield statistical power of 92%. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows v.18 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Results

In total, 448 subjects were screened and 172 who underwent retinography and adiponectin measurement were enrolled. They were aged 27 to 80 years, 73% had hypertension for more than five years, and had these and other characteristics similar to the overall sample. Patients were stratified according to adiponectin median [5.94 ng/ml, interquartile range (IQR): 2.48–11.09], and their characteristics are showed in Table 1. Individuals with adiponectin concentrations above the median had smaller waist circumference, lower prevalence of diabetes mellitus, lower HbA1c, and higher HDL cholesterol, with a trend toward association with lower triglycerides. Office BP and ABPM did not differ significantly between groups, but there was a trend for higher office DBP and lower night-time SBP among patients with adiponectin below the median. There were no statistically significant differences in relation to pharmacological treatment of hypertension, use of metformin or statins.

Table 2 presents the characteristics associated with arteriolar and venular calibers. Arteriolar caliber was directly correlated with age, inversely with HbA1c levels and tended to be smaller among subjects with non-white skin color and those with diabetes. There was a trend for association between arteriolar caliber and hs-CRP, as well as with office DBP. Venules were wider among men, and there was a trend for direct associations with smoking and waist circumference, and inverse association with HDL and adiponectin.

The analysis conducted by age stratum is presented in Table 3. No independent predictors of arteriolar caliber were detected in the multiple regression model among individuals aged 27-59 years. Among individuals 60 to 80 years old, log-adiponectin, HbA1C and the fellow vessel were independent predictors of arteriolar caliber,

presenting inverse association with caliber. For venular caliber, in opposition to arteriolar caliber, no significant predictors were identified among older individuals. For younger individuals, the full regression model for venular caliber was statistically significant, but only the fellow vessel was an independent predictor of venular caliber.

Discussion

The present study demonstrated an inverse association between plasma adiponectin and glycated hemoglobin with arteriolar caliber in hypertensive subjects aged 60 to 80 years. Independent predictors of venular caliber were not identified except the fellow vessel among younger individuals. The inverse association of arteriolar caliber with adiponectin suggested that higher levels could be marker of vascular damage. This could explain, at least partially, the association between higher adiponectin levels and poor cardiovascular prognosis among individuals with high cardiovascular risk (2).

Studies on animal models have shown that adiponectin reduces pathological microvessel formation on the hypoxic retina (19), and thiazolidinediones suppressed retinal neovascularization effectively only in animals expressing the adiponectin gene (20). Furthermore, in a clinical study, adiponectin was approximately 20 ng/dl lower among individuals with grade 3 and 4 hypertensive retinopathy compared to subjects with grade 1, according to Keith-Wagener classification (9).

Results on the association between adiponectin and arteriolar caliber detected in our study are opposite to those previously mentioned. This may have occurred because the study assessing hypertensive retinopathy (9) and both studies that investigated arterial stiffness in subjects with hypertension (5, 6) included individuals with lower

frequency of other cardiovascular risk factors. For example, diabetic subjects were excluded in two of these studies, while in the third one only 8.5% of participants had diabetes. They also included patients with less severe or more recent diagnosis of hypertension.

On the other hand, our results were similar to those reported among individuals with suspected coronary artery disease (CAD) (21), established CAD (3), and chronic heart failure (22). In these populations, high adiponectin was associated with worse prognosis, and was associated with the incidence of coronary events and mortality. Taking together, these findings suggest that high levels of adiponectin identify individuals at higher risk of having a cardiovascular event because of a previous clinically diagnosed cardiovascular disease or markers of subclinical cardiovascular disease, such as retinal vessel abnormalities. High levels of adiponectin could therefore be a marker of microvascular disease or dysfunction.

An unexpected finding was the direct association between age and arteriole caliber. In previous studies of retinal vessels and cardiovascular disease, age was analyzed mostly as a confounding factor, so that data on the association between aging and arteriolar narrowing are scarce. Leung *et al* (23) reported an inverse association between central retina arteriolar equivalent (an index for arteriolar caliber) and age in a population-based sample in which over 70% of individuals were over 60 years old and 45% were hypertensive. Notwithstanding, they also found an unexpected increase in arteriole-venular ratio (AVR) among men over 80 years of age, while among women of that age there was no further decrease of AVR. These observations, in addition to those made in our study, may be due to survival bias, i.e., people with narrower arterioles would have poorer health (and therefore they would

not be enrolled in our study) or died before older individuals with wider vessels. Age was a modifying factor of the association between adiponectin and arteriole caliber. In the Cardiovascular Health Study (24), age was an independently and directly associated with adiponectin concentration, which was directly associated with increased mortality. Our findings suggest that microvascular changes detected in the retinal vessels could intermediate the association of higher adiponectin levels and worse cardiovascular prognosis in the elderly.

Some limitations of our study deserve mention. It was not possible to isolate the effect of drug treatment. Use of beta-blocker was associated with lower concentrations of adiponectin (data not shown) and similar results were observed in patients with heart failure (25). Among these patients, beta-blocker use appears to be a determining factor in reversing the prognostic value of adiponectin (26). Other antihypertensive drugs such as ACE inhibitors and ARBs may also alter plasma adiponectin values (27, 28).

Although the number of subjects included in our study provides sufficient statistical power to detect associations in the analysis using continuous variables, it did not allow subgroup analysis. The cross-sectional design precludes the establishment of causal relationships, and inference about the prognostic value of adiponectin may only be made based on the previously described association between retinal vessels caliber and cardiovascular events (12, 13). Nevertheless, our study allowed to characterize the role of adiponectin in a context scarcely investigated, i. e., among hypertensive patients with high cardiovascular risk profile.

Conclusion

Adiponectin is inversely associated with retinal arteriolar caliber in older hypertensive subjects, suggesting that adiponectin is a marker of microvascular damage and of higher cardiovascular risk of hypertensive patients at this age stratum. Prospective investigations are needed to establish whether this association has a causal role.

References

1. Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt C, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD and Palin MF. Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* 2010;**37**:11-32.
2. Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Tchernova J, Cherry L, Wallace AM *et al.* Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Circulation* 2006;**114**:623-9.
3. Wilson SR, Sabatine MS, Wiviott SD, Ray KK, De Lemos JA, Zhou S *et al*; TIMI Study Group. Assessment of adiponectin and the risk of recurrent cardiovascular events in patients presenting with an acute coronary syndrome: observations from the Pravastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Trial-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22). *Am Heart J* 2011;**161**:1147-55.e1.
4. Ohashi K, Ouchi N and Matsuzawa Y. Adiponectin and hypertension. *Am J Hypertens* 2011;**24**:263-9.
5. Tsioufis C, Dimitriadis K, Selima M, Thomopoulos C, Mihas C, Skiadas I *et al.* Low-grade inflammation and hypoadiponectinaemia have an additive detrimental effect on aortic stiffness in essential hypertensive patients. *Eur Heart J* 2007; **28**:1162-9.
6. Mahmud A and Feely J. Adiponectin and arterial stiffness. *Am J Hypertens* 2005;**181**:543-8.
7. Windham BG, Griswold ME, Farasat SM, Ling SM, Carlson O, Egan JM *et al.* Influence of leptin, adiponectin, and resistin on the association between abdominal adiposity and arterial stiffness. *Am J Hypertens* 2010;**23**:501-7.
8. Youn JC, Kim C, Park S, Lee SH, Kang SM, Choi D *et al.* Adiponectin and progression of arterial stiffness in hypertensive patients. *Int J Cardiol* 2011 Jul 1. (E-pub ahead of print) doi:10.1016/j.ijcard.2011.06.061

9. Yilmaz MI, Sonmez A, Kilic S, Celik T, Bingol N, Pinar M *et al.* The association of plasma adiponectin levels with hypertensive retinopathy. *Eur J Endocrinol* 2005;**152**:233-40.
10. Maestri MM, Fuchs SC, Ferlin E, Pakter HM, Nunes G, Moraes RS *et al.* Detection of arteriolar narrowing in fundoscopic examination: evidence of a low performance of direct ophthalmoscopy in comparison with a microdensitometric method. *Am J Hypertens* 2007;**20**:501-5.
11. Rizzoni D, Porteri E, Duse S, De Ciuceis C, Rosei CA, La Boria E *et al.* Relationship between media-to-lumen ratio of subcutaneous small arteries and wall-to-lumen ratio of retinal arterioles evaluated noninvasively by scanning laser Doppler flowmetry. *J Hypertens* 2012;**30**:1169-75.
12. McGeechan K, Liew G, Macaskill P, Irwig L, Klein R, Klein BE *et al.* Meta-analysis: retinal vessel caliber and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 2009;**151**:404-13.
13. McGeechan K, Liew G, Macaskill P, Irwig L, Klein R, Klein BE *et al.* Prediction of incident stroke events based on retinal vessel caliber: a systematic review and individual-participant meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2009;**170**:1323-32.
14. Fuchs SC, Ferreira-da-Silva AL, Moreira LB, Neyeloff JL, Fuchs FC, Gus M *et al.* Efficacy of isolated home blood pressure monitoring for blood pressure control: randomized controlled trial with ambulatory blood pressure monitoring - MONITOR study. *J Hypertens* 2012;**30**:75-80.
15. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL *et al.* The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003;**289**:2560-72.
16. O'Brien E, Asmar R, Beilin L, Imai Y, Mallion JM, Mancia G *et al.* European Society of Hypertension Working Group on Blood Pressure Monitoring. European Society of

- Hypertension recommendations for conventional, ambulatory and home blood pressure measurement. *J Hypertens* 2003;**21**:821–48.
17. Pakter HM, Ferlin E, Fuchs SC, Maestri MK, Moraes RS, Nunes G *et al.* Measuring Arteriolar-to-Venous Ratio in Retinal Photography of Patients With Hypertension: Development and Application of a New Semi-Automated Method. *Am J Hypertens* 2005;**18**:417-421
 18. Victora CG, Huttly SR, Fuchs SC and Olinto MT. The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol* 1997;**26**:224-7.
 19. Higuchi A, Ohashi K, Kihara S, Walsh K and Ouchi N. Adiponectin suppresses pathological microvessel formation in retina through modulation of tumor necrosis factor- α expression. *Circ Res* 2009;**104**:1058-65.
 20. Higuchi A, Ohashi K, Shibata R, Sono-Romanelli S, Walsh K and Ouchi N. Thiazolidinediones reduce pathological neovascularization in ischemic retina via an adiponectin-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;**30**:46-53.
 21. Pilz S, Mangge H, Wellnitz B, Seelhorst U, Winkelmann BR, Tiran B *et al.* Adiponectin and mortality in patients undergoing coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:4277–4286
 22. Kistorp C, Faber J, Galatius S, Gustafsson F, Frystyk J, Flyvbjerg A *et al.* Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005;**112**:1756-62.
 23. Leung H, Wang JJ, Rochtchina E, Tan AG, Wong TY, Klein R *et al.* Relationships between age, blood pressure, and retinal vessel diameters in an older population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;**44**:2900-4
 24. Kizer JR, Arnold AM, Strotmeyer ES, Ives DG, Cushman M, Ding J *et al.* Change in circulating adiponectin in advanced old age: determinants and impact on physical

- function and mortality. The Cardiovascular Health Study All Stars Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010;**65**:1208-14.
25. Biolo A, Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sonoda M, Walsh K *et al.* Determinants of adiponectin levels in patients with chronic systolic heart failure. *Am J Cardiol* 2010;**105**:1147-52.
26. Van Berendoncks AM, Beckers P, Hoymans VY, Possemiers N, Coenen S, Elseviers MM *et al.* Beta-blockers modify the prognostic value of adiponectin in chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2011;**150**:296-300.
27. Inoue Y, Kakuma T, Nonaka Y, Sumi S, Okamura K, Kodama S *et al.* Beneficial effect of combination therapy comprising angiotensin II receptor blocker plus calcium channel blocker on plasma adiponectin levels. *Clin Exp Hypertens* 2010;**32**:21-8.
28. Nakamura T, Kawachi K, Saito Y, Saito T, Morishita K, Hoshino J *et al.* Effects of ARB or ACE-inhibitor administration on plasma levels of aldosterone and adiponectin in hypertension. *Int Heart J* 2009;**50**:501-12.

Table 1. Sample characteristics according to median* of plasma adiponectin concentration [mean \pm SD, median (IQ range) or n (%)]

Characteristics	Adiponectin		P value
	< median (n=86)	\geq median (n=86)	
Age (years)	58.3 \pm 11.3	61.2 \pm 10.8	0.09
Men	40.7	32.6	0.3
Non-white	27.9	25.6	0.7
Smoking (pack-years)			
Zero	62.2	52.9	0.4
0.01-5.4	8.5	14.1	
\geq 5.41	29.3	32.9	
Body mass index (kg/m ²)	30.2 \pm 4.7	29.4 \pm 5.2	0.3
Waist circumference (cm)	102.0 \pm 10.0	98.6 \pm 11.8	0.04
Office blood pressure			
SBP (mmHg)	151.0 \pm 19.2	149.6 \pm 17.8	0.6
DBP (mmHg)	86.7 \pm 11.3	83.9 \pm 10.4	0.09
ABPM (mmHg)			
24h SBP	131.5 \pm 16.0	135.6 \pm 16.1	0.14
24h DBP	77.59 \pm 11.9	78.28 \pm 11.0	0.7
Daytime SBP	135.27 \pm 15.86	138.99 \pm 16.1	0.2
Daytime DBP	80.959 \pm 12.46	81.7 \pm 11.18	0.17
Night-time SBP	123.9 \pm 18.259	129.2 \pm 19.146	0.09
Night-time DBP	70.7 \pm 12.09	71.59 \pm 12.29	0.7
Diabetes mellitus	50.0	33.7	0.03
HbA1c (%)	6.84 \pm 1.44	6.37 \pm 0.81	0.008
Serum creatinine (mg/dl)	0.94 \pm 0.24	0.97 \pm 0.28	0.5
HDL cholesterol (mg/dl)	45.7 \pm 10.9	50.7 \pm 14.0	0.02
Total cholesterol (mg/dl)	198.8 \pm 44.2	201.6 \pm 39.6	0.7
Triglycerides	155.0 (108.0- 215.5)	126.5 (100.5- 167.0)	0.055
C-Reactive protein	2.7 (1.6-4.4)	2.8 (1.6-5.2)	0.9

Continues

Table 1. (Continuing)

Characteristics	Adiponectin < median (n=86)	Adiponectin ≥ median (n=86)	P value
Previous history of CVD**	24.4	22.1	0.7
Drug therapy			
Thiazide diuretics	58.1	59.3	0.9
Beta-blockers	46.5	44.2	0.8
ACE inhibitors	67.4	66.3	0.9
ARB	3.5	8.1	0.19
Calcium channel blockers	23.3	33.7	0.13
Metformin	9.3	7.0	0.6
Simvastatin	17.4	17.4	1.0

*Median of adiponectin = 5.94 ng/ml

**Previous history of stable angina, acute coronary syndrome, myocardial revascularization, heart failure, stroke, or peripheral obstructive arterial disease
SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; ABPM: ambulatory blood (cont.) (continuing) pressure monitoring; CVD: cardiovascular disease; ACE: angiotensin converting enzyme; ARB: angiotensin receptor blocker

Table 2. Characteristics associated with retinal vessel caliber

Characteristics	Arterioles		Venules	
	(mean \pm SD* or ρ^\dagger)	<i>P</i>	(mean \pm SD* or ρ^\dagger)	<i>P</i>
Age (years)	0.183	0.03	0.072	0.4
Sex		0.5		0.04
Men	108.5 \pm 8.7		132.3 \pm 17.9	
Women	107.2 \pm 11.7		127.2 \pm 11.4	
Skin color		0.16		0.5
White	108.5 \pm 11.5		128.5 \pm 14.7	
Non-white	105.6 \pm 8.4		130.4 \pm 13.0	
Smoking (pack-years)	-0.069	0.4	0.134	0.12
Body mass index (kg/m ²)	-0.016	0.8	0.065	0.4
Waist circumference (cm)	0.011	0.9	0.140	0.10
HbA1c (%)	-0.211	0.01	-0.013	0.9
Diabetes mellitus		0.06		1.0
Yes	105.7 \pm 9.0		129.1 \pm 15.5	
No	109.1 \pm 11.7		129.0 \pm 13.3	
Previous CVD		0.5		1.0
Yes	108.9 \pm 12.2		129.1 \pm 14.2	
No	107.3 \pm 10.2		129.0 \pm 14.2	
Log-Adiponectin	-0.068	0.5	-0.112	0.19
Serum creatinine (mg/dl)	0.15	0.11	0.18	0.04
HDL cholesterol (mg/dl)	-0.063	0.5	-0.145	0.10
Total cholesterol (mg/dl)	-0.077	0.4	-0.024	0.8
Log-C-reactive protein	-0.154	0.08	-0.018	0.8
Office SBP (mmHg)	-0.089	0.3	-0.004	1.0
Office DBP (mmHg)	-0.156	0.07	-0.005	0.9

Continues

Table 2. (Continuing)

Characteristics	Arterioles	P	Venules	P
	(mean \pm SD* or ρ †)		(mean \pm SD* or ρ †)	
ABPM (mmHg)				
24h SBP	-0.052	0.6	-0.035	0.7
24h DBP	-0.080	0.4	0.019	0.8
Daytime SBP	-0.047	0.6	-0.019	0.8
Daytime DBP	-0.066	0.4	0.043	0.6
Night-time SBP	-0.073	0.4	-0.096	0.3
Night-time DBP	-0.081	0.4	-0.042	0.6

*Vessel diameter in μ m; †Spearman's correlation coefficient

Table 3. Multiple linear regression model of retinal vessels determinants in hypertensive patients according to age

Characteristics	27-59 years (n=90)		60-80 years (n=82)	
	Adjusted β^*	P value	Adjusted β^*	P value
Arteriolar caliber (μm)				
Age (years)	-0.063	0.6	0.170	0.11
Non-white skin color	-0.187	0.13	-0.048	0.6
Adiponectin-log (ng/ml)	-0.005	1,0	-0.410	<0.001
HbA1c (%)	-0.217	0.08	-0.362	0.001
PCRlog	-0.193	0.12	-0.074	0.5
Office DBP (mmHg)	-0.162	0.2	-0.073	0.5
Venular caliber (μm)	0.135	0.3	0.276	0.008
Full model	R ² = 0.20	P=0.07	R ² = 0.44	P<0.001
Venular caliber (μm)				
Female sex	-0.142	0.3	-0.003	1.0
Smoking (pack-years)	0.211	0.08	-0.063	0.6
HDL cholesterol (mg/dl)	-0.102	0.5	-0.066	0.6
Adiponectin-log (ng/ml)	-0.106	0.4	-0.002	1.0
Waist circumference (cm)	0.148	0.3	0.064	0.6
Arteriolar caliber (μm)	0.298	0.02	0.325	0.03
Full model	R ² =0.24	P=0.02	R ² =0.14	P=0.2

* Adjusted for all variables in the table, separately for arteriole and venular calibers.

8. Conclusões

A investigação realizada nesse estudo permitiu estabelecer associações de variáveis clínicas, sociodemográficas e laboratoriais com calibre dos vasos da retina, utilizando análise microdensitométrica de retinografias, em pacientes hipertensos. Idade, hemoglobina glicada e adiponectina foram preditores independentes de calibre arterial em indivíduos mais velhos, detectada em modelo multivariado que integrou diferentes níveis de exposições a fatores de risco. No modelo hierarquizado construído para calibre venular, não se identificaram preditores independentes. Esses dados sugerem a influência de fatores metabólicos na determinação do calibre arteriolar, e que outros fatores, diferentes dos estudados, são relevantes na determinação do calibre de vênulas.

No estudo do polimorfismo G894T do gene NOS3, hemoglobina glicada e colesterol total foram preditores independentes do calibre arteriolar. Identificou-se associação independente entre calibre venular e índice de massa corporal e tabagismo nessa amostra. O polimorfismo de interesse da enzima óxido nítrico sintase endotelial não foi associado ao fenótipo estudado.

9. Considerações finais

Desenvolver e aplicar um modelo inovador na investigação de mecanismos fisiopatológicos em seres humanos foi o principal desafio dessa tese. Apesar de algumas limitações, os estudos conduzidos e aqui apresentados permitiram aplicar conhecimentos desenvolvidos no campo da pesquisa epidemiológica para avaliação de marcadores moleculares que têm potencial implicação na gênese e no curso clínico das doenças cardiovasculares.

A aspiração não foi a de estabelecer relações causais ou fornecer evidências equivalentes às originadas pela experimentação em modelos animais ou in vitro. No entanto, foi possível estabelecer modelos úteis para a análise exploratória da utilidade e significância desses marcadores. Isso porque, através deles, podemos aproximar a visualização direta de processos patológicos da microcirculação ao contexto clínico e sociodemográfico da população estudada. Essas informações carregam consigo exposições ambientais, hábitos, sejam benéficos ou não, entre outros fatores, que não podem ser controlados e avaliados propriamente nos estudos experimentais.

Essa contextualização é útil porque possibilita avaliar precocemente a relevância clínica de um biomarcador e porque instiga o aprofundamento da pesquisa experimental naqueles pontos que se mostraram mais relevantes no contexto clínico. A avaliação completa da utilidade de um biomarcador não faz parte do escopo desses trabalhos, assim como não faz o estabelecimento de vias bioquímicas implicadas nas alterações microvasculares associadas à hipertensão. Mas esses estudos certamente serviram para gerar hipóteses e suscitar novas perguntas que se

tornarão projetos de pesquisa. A continuidade desse trabalho é que poderá responder às questões deixadas em aberto, como por exemplo, qual é a gênese do paradoxo do adiponectina, e qual a influência da idade nessa associação? Ainda, estamos diante de dois marcadores prognósticos independentes, ou adiponectina pode exercer alguma influência direta sobre o remodelamento microvascular, a exemplo do que ocorre com a insulina? Quanto aos fatores genéticos, outros genes, na via da síntese do óxido nítrico, ou outros SNPs no gene NOS3, podem influenciar o calibre vascular?

Espera-se continuar utilizando a análise do calibre vascular da retina como medida *in vivo* de alterações microvasculares, seja pela microdensitometria ou pela incorporação de novas tecnologias, e ampliar a variedade de marcadores moleculares investigados.