

Artículo Original

Variabilidad fenotípica y Estrés Oxidativo Endotelial en una familia con Hiperaldosteronismo Familiar tipo I

Carlos B. Stehr^{1*}, Cristian A. Carvajal^{1a}, Hernán Alcaíno^{3a}, Patricia Lacourt², Andreína Cattani², Lorena M. Mosso¹, Carlos E. Fardella¹.

Phenotypical variability and Endothelial Oxidative Stress in a family with type I Familial Hyperaldosteronism

Background: Type I familial hyperaldosteronism (HAF-I) is caused by the presence of a chimeric gene CYP11B1/CYP11B2 which encodes an enzyme with aldosterone synthetase activity regulated by ACTH. HAF-I patients present with severe hypertension at young ages and a greater risk of stroke. **Aim:** To characterize clinical and biochemical presentation of family members with HAF-I. To evaluate endothelial oxidative stress markers before and after glucocorticoid treatment. **Patients and Methods:** We evaluated three family members with HAF-I confirmed with a genetic test (XL-PCR) for chimeric gene CYP11B1/CYP11B2. The index case was a 13 years old boy with stage 2 hypertension (Joint National Committee VIIth report), plasma aldosterone/ plasma renin activity (AP/ARP) ratio of 161 and normal plasma potassium. His father had primary hyperaldosteronism diagnosed at 25 years of age with hypertension and hypokalemia. His sister was 15 years old, with a normal blood pressure and an AP/ARP ratio of 37.6. **Results:** All subjects had plasma xanthine-oxidase levels in the upper limit of normal. Malondialdehyde was above normal in the index case and his father. These markers returned to normal with glucocorticoid treatment. **Conclusions:** We report a HAF-I carrying family with a wide phenotypical variability between affected members. Elevation of endothelial oxidative stress markers and its normalization after glucocorticoid treatment, may indicate that aldosterone produces endothelial damage and increases cardiovascular risk.

¹Departamento de Endocrinología, ²Dpto. Pediatría, Unidad Endocrinología Infantil, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

³Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

^a: Bioquímico

Correspondencia a:
Carlos Fardella B.

Departamento de Endocrinología
Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Lira 85, 5° piso
Santiago-Chile.

Teléfono: 056-02-354 3095.

Fax: 056-02-638 5675.

E-mail: cfardella@med.puc.cl

* Dr. Carlos Stehr se encuentra realizando residencia en Endocrinología con financiamiento de la Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes.

Recibido el 11 de octubre, 2007.

Aceptado el 2 de noviembre, 2007.

Introducción

El hiperaldosteronismo primario (HAP) se debe a la producción autónoma de aldosterona por la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal. Su secreción es independiente del eje renina angiotensina, por lo que en este tipo de pacientes se encuentran niveles de renina suprimida con aldosterona elevada. La hipertensión arterial en estos casos se debe a la acción de la aldosterona a nivel renal, aumentando la reabsorción renal de sodio, el volumen intravascular y, por lo tanto, la presión arterial¹. La aldosterona produce efectos directos sobre varios órganos, describiéndose daño a nivel del corazón y endotelio, lo que podría traducirse en fibrosis miocárdica, reducción de la fibrinólisis y disfunción endotelial. En diferentes estudios se ha demostrado que los pacientes con HAP tienen más incidencia de hipertrofia ventricular izquierda y mayor cantidad de eventos cardiovasculares que los esperados para su nivel de presión arterial al compararlos con hipertensos esenciales^{2,4}.

Investigaciones recientes señalan que la elevación de la aldosterona plasmática (AP) podría jugar un rol en la progresión de la enfermedad cardiovascular. Al combinarse la

aldosterona con dieta rica en sodio se induce una respuesta vascular inflamatoria que es independiente de la elevación de la presión arterial. Esta respuesta se caracteriza por infiltración perivascular de leucocitos y remodelación vascular fibrinoide de la capa media vascular⁵.

Estudios en ratas con hipertensión arterial inducida por aldosterona mostraron aumento del estrés oxidativo endotelial (EOE) y de la respuesta génica secundaria a ésta, la cual fue sustancialmente abolida al administrar antagonistas del receptor de mineralocorticoides. En animales tratados con eplerenona se ha demostrado una disminución del EOE, grosor de la íntima e inflamación vascular^{6,7}. Un marcador de EOE es la xantina-oxidasa, enzima encargada de catalizar el paso de hipoxantina a xantina. La elevación de esta enzima aumenta la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (EROS), con la consiguiente oxidación de moléculas a nivel endotelial, entre las cuales se encuentran los ácidos grasos⁸. Algunos productos de este fenómeno oxidativo pueden ser medidos, como lo es el malondialdehído, molécula derivada de la oxidación de ácidos grasos a nivel endotelial^{9,10}.

Un modelo ideal para evaluar el efecto de aldosterona en

estos marcadores lo constituye el hiperaldosteronismo primario familiar tipo I (HAF-I), ya que en estos pacientes el exceso de aldosterona se normaliza con el uso de glucocorticoides a diferencia de otras patologías, en las cuales sólo es posible bloquear el efecto de aldosterona con el uso de espironolactona. Esto es así porque en el HAF-I la producción de aldosterona se encuentra bajo el control de la ACTH y, por lo tanto, es posible tratar administrando glucocorticoides.

El HAF-I se produce por una recombinación desigual entre los genes que codifican para la 11 β -hidroxilasa (CYP11B1) y la aldosterona sintetasa (CYP11B2), resultando un gen quimérico que tiene actividad de aldosterona sintetasa, pero regulado por ACTH^{11,13}. Este gen quimérico contiene, en su porción amino terminal, los elementos que determinan la respuesta a ACTH, fusionados a la secuencia codificadora del gen CYP11B2. Sujetos con HAF-I presentan hipertensión arterial más severa y una mayor incidencia de eventos vasculares cerebrales que pacientes portadores de HAP esporádico¹⁴. Sin embargo, se reportó en 1 familia italiana sujetos portadores del gen quimérico CYP11B1/CYP11B2 sin manifestaciones clínicas de hiperaldosteronismo¹⁵.

Recientemente, nuestro grupo detectó una familia en la cual tres de sus miembros son portadores de hiperaldosteronismo familiar tipo I. El objetivo del estudio fue caracterizar la presentación clínica y bioquímica de familiares con HAF-I, evaluando además marcadores de EOE antes y a los 2 meses de iniciado el tratamiento específico con glucocorticoides en estos pacientes.

Pacientes y Métodos

Pacientes:

El caso índice corresponde a un varón de 13 años que consultó por hipertensión arterial (HTA) 180/110 mmHg. El estudio de hipertensión arterial secundaria demostró aldosterona plasmática (AP) 48,4 ng/dL; actividad de renina plasmática (ARP) <0,2 ng/ml·h y relación AP/ARP 161,3, diagnosticándose hiperaldosteronismo primario. Potasio plasmático (3,5 mEq/L) y TAC de suprarrenales normales. Se inició tratamiento antihipertensivo con Nifedipino lográndose normalización de cifras tensionales (Tabla 1). A su padre se le diagnosticó HAP a los 25 años de edad en relación a HTA etapa 2 (criterios JNC VII) e hipokalemia severa; actualmente en tratamiento con amiloride 20 mg c/12 h vo; AP 69,4 ng/dL; ARP 1,5 ng/ml·h; relación AP/ARP 46,2; potasio plasmático normal (4,2 mEq/L); índice de masa corporal (IMC) 31,2 (Tabla 1). El caso índice tiene 2 hermanas, de 16 y 15 años, siendo la hermana mayor sólo por línea paterna. Ambas son normotensas y no tienen antecedentes mórbidos de importancia. La hermana menor, de 15 años, es eutrófica (IMC 22,8), destacando AP 11,3 ng/dL; ARP <0,2 ng/ml·h; relación AP/ARP 37,6 y potasio plasmático normal (4,1 mEq/L) (Tabla 1).

Para confirmar la existencia de un HAF-I se realizó estudio genético para gen quimérico CYP11B1/CYP11B2 al caso índice y a 12 familiares directos, encontrándose afectados sólo el caso índice, su padre y hermana de 15 años (Figura 1), no pesquisándose la mutación en otros integrantes de la familia.

En los 3 casos que se confirmó el diagnóstico de HAF-I, se evaluó antes y a los 2 meses de iniciado el tratamiento con glucocorticoides: presión arterial, AP, ARP, potasio plasmático, malondialdehído (MDA) y xantín-oxidasa (XO). Antes de iniciar los glucocorticoides se evaluó la edad ósea, tanto en el caso índice como en su hermana. El tratamiento específico se realizó con dexametasona en el padre (0,5 mg/día vo) y hermana (0,25 mg/día vo). En el caso índice, por encontrarse en periodo de crecimiento, se indicó cortisol (10 mg/m² superficie corporal, fraccionado en 3 dosis diarias) para evitar supresión del eje hipófis suprarrenal y no interferir con la talla final. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes de acuerdo a las guías de la declaración de Helsinki y la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Métodos:

Evaluación bioquímica.

La AP fue medida por radioinmunoensayo directo utilizando un kit comercial (Diagnostic Products, Los Angeles CA). La variación intra e interensayo fue 5,1% y 7,1% respectivamente, siendo el valor normal de 1 a 16 ng/dL. La ARP fue evaluada por radioinmunoanálisis de Angiotensina I, obtenida por generación enzimática, kit comercial DIASORIN con variabilidad intra e interensayo de 6,1% y 6,6%, respectivamente. Su rango de normalidad se encuentra entre 1,3 y 4 ng/ml·h. El límite inferior de determinación de ARP fue 0,2 ng/ml·h. El potasio plasmático fue medido por potenciometría indirecta-ion selectivo en equipo automatizado HITACHI, con límites de referencia entre 3,5-5,0 mEq/L.

Evaluación de estrés oxidativo endotelial.

Los niveles plasmáticos de MDA fueron determinados por medio de la técnica descrita por Castro et al.¹⁶. Se realizó una curva de calibración con una solución estándar de MDA (Merck) 100 μ M. Luego, a 300 μ L de plasma se agregaron 200 μ L de TCA 10% y 500 μ L de TBA y se colocaron a baño maría durante 1 hora a 90°C. Luego de enfriar los tubos, se procedió a una centrifugación de 3.500 x g durante 10 minutos a 4°C, y las absorbancias del sobrenadante se determinaron por espectrofotometría a 532nm. La concentración de MDA se expresó en μ M. Las variaciones inter e intraensayo fueron de 2,1% y 5,3%, respectivamente, siendo sus márgenes de referencia entre 0,3 a 1,1 μ M.

La actividad de XO en plasma se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Prajda et al.¹⁷, en la cual se

Artículo Original

siguió, espectrofotométricamente a 290 nm, la formación de ácido úrico a partir de una solución de xantina. La actividad se expresó como unidades arbitrarias (UA) por mL de plasma, con un rango normal de referencia de 0,06 a 0,23 UA x ml⁻¹ x min⁻¹. Las variaciones inter e intraensayo fueron 6,5% y 5,2%, respectivamente.

Estudio genético.

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Jonsson¹⁸. Se determinó la presencia del gen quimérico CYP11B1/CYP11B2 y del gen de la aldosterona sintetasa CYP11B2. El DNA genómico se extrajo de leucocitos de sangre periférica. El DNA aislado de cada paciente fue sometido a 2 reacciones de amplificación realizadas simultáneamente mediante XL-PCR. En la primera reacción el primer *sense* (5' TCC TTC ATC TAC CTT TGG CTG GGG 3') es específico para la región 5' del gen de la aldosterona sintetasa. En la segunda reacción el primer *sense* (5' TCA TGC ACC CCC AAT CAG TCC CTG 3') es específico para la región 5' del gen de 11β-hidroxilasa. En ambas reacciones el primer *antisense* (5' GAG TCC TCC AGC TGC CTC TCA ACC 3') es específico para la región del intron E del gen de la aldosterona sintetasa. Los *primers* están dirigidos contra regiones de la CYP11B1 y CYP11B2 que no son homólogas entre ellas, permitiendo la especificidad de la reacción. En cada reacción se incluyó un control positivo y otro negativo para confirmar la especificidad de la reacción. El producto de amplificación se visualizó en transiluminador-UV tras electroforesis en gel de Agarosa 0,8% con bromuro de etidio.

Resultados

Variabilidad fenotípica.

El caso índice debutó con hipertensión arterial etapa 2 (JNC VII), sin hipokalemia, a diferencia de su padre, quien al momento del diagnóstico de hiperaldosteronismo primario presentaba hipertensión arterial etapa 2 (JNC VII) asociado a hipokalemia importante, la cual se corrigió con amiloride 20 mg c/12 hrs vo. La hermana, a pesar de ser portadora del gen quimérico CYP11B1/CYP11B2, tenía presión arterial y potasio plasmático normales.

Los tres pacientes al momento de la evaluación presentaban presión arterial y potasio plasmático normales, encontrándose el caso índice y su padre bajo tratamiento antihipertensivo. En el caso índice se observó una relación AP/ARP muy elevada, seguida en magnitud por la del padre y hermana (161, 3, 56, 2 y 37, 6 respectivamente) (Tabla 1). Tras 2 meses de tratamiento con glucocorticoides los pacientes persistieron normotensos, habiéndose suspendido el tratamiento antihipertensivo en el caso índice y en su padre. En este último se suspendió el amiloride, manteniendo el potasio plasmático normal. El padre y la hermana, que fueron tratados con dexametasona, normalizaron su AP (5,1 y 15 ng/dL), ARP (3,1 y 0,9 ng/ml·hr

y relación AP/ARP (1,64 y 17,3 respectivamente). En el caso índice se observó normalización de AP (8,7 ng/dL), persistiendo suprimida la ARP. La relación AP/ARP disminuyó a 29.

Marcadores de estrés oxidativo endotelial.

En los tres pacientes estudiados se observó aumento en los marcadores de estrés oxidativo endotelial, variando la magnitud del aumento entre ellos. Los niveles de Malondialdehído se encontraron elevados en los 3 pacientes, siendo mayores en el caso índice y su padre (2,3 uM y 2,1uM, respectivamente) que en la hermana (1,5 uM). En todos los pacientes los niveles basales de xantin-oxidasa se encontraron en el límite superior del rango de referencia (Tabla 2).

Tras 2 meses de tratamiento con glucocorticoides se observó en los tres pacientes normalización de la aldosterona plasmática y de la relación AP/ARP sólo en el padre y en la hermana. En el caso índice la relación se mantuvo levemente elevada en relación a ARP suprimida. Los marcadores de estrés oxidativo endotelial se normalizaron con el tratamiento en todos los pacientes (Tabla 2).

Discusión

Este estudio demuestra una gran variabilidad en la expresión fenotípica en sujetos portadores de HAF-I en una familia chilena. Además, encontramos una elevación de los marcadores de EOE que se normalizaron con la corrección de la aldosterona plasmática.

En relación al fenotipo, en esta familia encontramos que los pacientes portadores del gen quimérico CYP11B1/CYP11B2 presentan variabilidad fenotípicas entre ellos. En el caso índice, la hipertensión arterial se inició a una edad temprana, sin presentar hipokalemia, mientras que su hermana 2 años mayor, es normotensa y solamente presenta evidencias bioquímicas de exceso de aldosterona. Su padre debutó con hipokalemia severa asociada a la hipertensión arterial. Este hecho ha sido comunicado por Fallo et al.¹⁵ en una familia italiana en la cual el padre del caso índice era normotenso a pesar de ser portador del gen quimérico CYP11B1/CYP11B2. La variabilidad fenotípica encontrada no puede ser explicada por factores ambientales como la alimentación o la ingesta de sodio, ya que los tres sujetos viven en el mismo hogar, no existiendo diferencias de este tipo entre ellos, a pesar de que el padre era obeso y los 2 hijos eutróficos. Otra explicación podría ser la existencia de penetrancia génica incompleta, dada por la presencia de genes protectores para el desarrollo de hipertensión arterial en la paciente afectada, pero normotensa.

Encontramos elevación de los marcadores de EOE en los tres pacientes (MDA, XO). Este hallazgo apoya la hipótesis de que la aldosterona es capaz de estimular directamente la producción a nivel del endotelio de EROS con

el consiguiente aumento de XO⁹, produciéndose la oxidación de lípidos de membrana y el consiguiente aumento del MDA¹⁰.

Al tratar a los pacientes con glucocorticoides se observa que los dos que recibieron dexametasona normalizaron la AP, la ARP y la relación entre ellas. En el caso índice se normalizó la AP, manteniendo una relación AP/ARP levemente elevada. Este hecho se debe, probablemente, a que este paciente por encontrarse aún en etapa de crecimiento fue tratado con cortisol, el cual tiene menor vida media y menor efecto supresor sobre el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. Este menor efecto supresor de ACTH no sería capaz de mantener la ARP en un nivel normal durante todo el día, pero sí lograría normalizar la AP, previniendo la exposición del endotelio vascular a concentraciones suprafiológicas de aldosterona. Tras el tratamiento se observó disminución y normalización de los marcadores de EOE, aportando nueva evidencia sobre el efecto deletéreo de la aldosterona sobre el endotelio, el cual sería reversible al normalizar la aldosterona. El uso de glucocorticoides en estos pacientes no debería influir sobre la disminución del EOE, ya que los glucocorticoides ejercen su efecto antiinflamatorio actuando sobre la expresión de reguladores génicos como son el NF- κ B y el activador de proteína 1¹⁹.

Éstos se encuentran involucrados en la respuesta inflamatoria en una etapa posterior a la formación de EROS y el aumento de xantin-oxidasa. Estudios experimentales han reportado un aumento en la expresión de xantin-oxidasa con el uso de dexametasona²⁰.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones, siendo la primera el bajo número de pacientes incluidos en la evaluación. El HAF-I corresponde a menos del 1% de los pacientes portadores de hiperaldosteronismo primario, teniendo una baja incidencia en la población general, lo que no permite obtener una casuística más extensa. Otra posible limitación es el corto período de tratamiento con glucocorticoides, sin embargo, en este tiempo se logró normalizar los marcadores de estrés oxidativo.

En conclusión, en este estudio pudimos observar una amplia variabilidad fenotípica en pacientes portadores de HAF-I, sugiriendo que este cuadro no siempre se presenta como una enfermedad grave. La elevación de los marcadores de EOE y su posterior normalización con el tratamiento del HAF-I aporta nueva evidencia sobre el posible mecanismo fisiopatológico por el cual la aldosterona produciría daño a nivel del endotelio y aumento del riesgo cardiovascular. Los resultados obtenidos deben ser confirmados en un estudio de mayor tamaño.

Tabla 1. Características clínicas y bioquímicas antes del tratamiento con glucocorticoides en pacientes con hiperaldosteronismo primario familiar tipo I.

| | Edad (años) | P° Art. (mmHg) | IMC | AP (ng/dL) | ARP (ng/ml-h) | AP/ARP | K ⁺ (mEq/L) |
|--------------------|----------------|-------------------|------|---------------|------------------|--------|---------------------------|
| Caso Índice | 13 | 110/60 | 18,6 | 48,4 | <0,2 | 161,3 | 3,5 |
| Padre | 45 | 130/80 | 31,2 | 69,4 | 1,5 | 46,2 | 4,2 |
| Hermana | 15 | 120/80 | 22,8 | 11,3 | <0,2 | 37,6 | 4,1 |

P° Art = Presión Arterial. IMC = índice de Masa Corporal. AP = Aldosterona plasmática. ARP = Actividad de Renina Plasmática. K+= Potasio plasmático.

Artículo Original

Tabla 2. Marcadores de estrés oxidativo antes y 2 meses post inicio de glucocorticodes en pacientes con hiperaldosteronismo familiar tipo I.

| | | P° Art. mmHg. | AP VR: 2,5-16 ng/dL | AP/ARP VR: <25 | XO VR:0,06-0,23 UAxmL ⁻¹ x min ⁻¹ | MDA VR:0,3-1,1 uM |
|--------------------|------|------------------|---------------------------|-------------------|--|----------------------|
| Caso índice | Pre | 110/60 | 48,4 | 161 | 0,23 | 2,3 |
| | Post | 130/80 | 8,7 | 29 | 0,14 | 1,1 |
| Padre | Pre | 130/80 | 69,4 | 46,2 | 0,25 | 2,1 |
| | Post | 129/83 | 5,1 | 1,64 | 0,15 | 1,2 |
| Hermana | Pre | 120/80 | 11,3 | 37,6 | 0,23 | 1,5 |
| | Post | 96/61 | 15,6 | 17,3 | 0,16 | 1,1 |

P° Art = Presión Arterial. AP = Aldosterona plasmática. AP/ARP = Relación Aldosterona plasmática/Actividad de Renina Plasmática. XO = xantin-oxidasa. MDA = Malondialdehído. VR = Valor de Referencia.

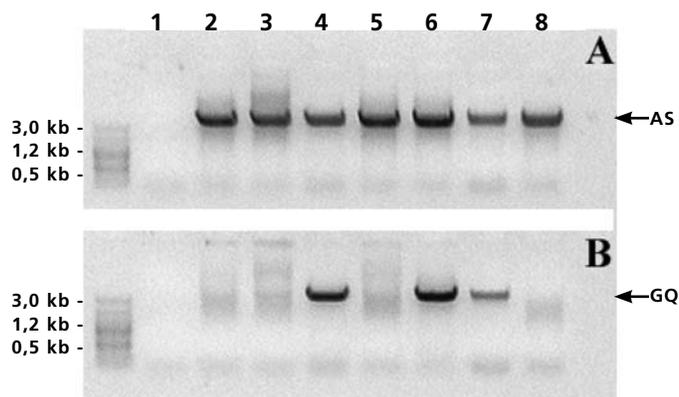


Figura 1. Amplificación por XL-PCR de gen quimérico CYP11B1/CYP11B2 (GQ) y gen de la aldosterona sintetasa CYP11B2 (AS) en DNA de leucocitos de caso índice, padre, 2 hermanas y abuelos paternos. Columnas de derecha a izquierda: 1.- H₂O. 2.- Abuelo paterno. 3.- Abuela paterna. 4.- Padre. 5.- Hermana sana. 6.- Hermana portadora. 7.- Caso índice. 8.- Control negativo.

Financiamiento: Fondecyt N° 1070876. Proyecto becado UC PG-11/07.

Referencias

1. Takeda R, Hatakeyama H, Takeda Y, Iki K, Miyamori I, Sheng WP, Yamamoto H, Blair IA. 1995. Aldosterone biosynthesis and action in vascular cells. *Steroids*. 60(1):120-124. (Erratum in: *Steroids* 1995;60(8):540).
2. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. 2005. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary hyperaldosteronism. *J Am Coll Cardiol*. 45(8): 1243-1248.
3. Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P, et al. 1996. Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension*. 27: 1039-1045.
4. Takeda R, Matsubara T, Miyamori I, Hatakeyama H, Morise T. 1995. Vascular complications in patients with aldosterone producing adenoma in Japan: comparative study with essential hypertension. The Research Committee of Disorders of Adrenal Hormones in Japan. *J Endocrinol Invest*. 18: 370-373.
5. Young M, Head G, Funder J. 1995. Determinants of cardiac fibrosis in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats by inhibition of the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol*. 10 (Suppl 11): S143-S148.
6. Keidar S, Hayek T, Kaplan M, Pavlotzky E, Hamoud S, Coleman R, Aviram M. 2003. Effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on blood pressure, serum and macrophage oxidative stress, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 41:955-963.
7. Takai S, Jin D, Muramatsu M, Kirimura K, Sakonjo H, Miyazaki M. 2005. Eplerenone inhibits atherosclerosis in nonhuman primates. *Hypertension*. 46:1135-1139.

8. Landmesser U, Drexler H. 2007. Endothelial function and hipertensión. *Curr Opin Cardiol.* 22:316-320.
9. Ozkul A, Akyol A, Yenisey C, Arpacı E, et al. 2007. Oxidative stress in acute ischemic stroke. *J Clin Neurosci.* doi:10.1016/j.jocn.2006.11.008.
10. Glowinska-Olszewska B, Urban M. 2007. Elevated Matrix Metalloproteinase 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 in obese children and adolescents. *Metabolism Clinical and Experimental.* 56:799-805.
11. Jackson RV, Lafferty A, Torpy DJ, Stratakis C. 2002. New genetic insights in familial hyperaldosteronism. *Ann N Y Acad Sci.* 970:77-88.
12. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S et al. 1992. A chimeric 11 β -hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature.* 355: 262-265.
13. Pascoe L, Curnow K, Slutsker L, Connell JM, Speiser PW, New MI, et al. 1992. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossover between CYP11B1 and CYP11B2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:8327-8331.
14. McMahon G, Dluhy R. 2004. Glucocorticoid remediable hyperaldosteronism. *Arqs Bras Endocrinol Metabo.* 48(5): 682-686.
15. Fallo F, Pilon C, Williams TA, Sonino N, Morra Di Cella S, et al. 2004. Coexistence of different phenotypes in a family with glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Journal of Human Hypertension.* 18:47-51.
16. Castro P, Greig D, Perez O, Moraga F, Chiong M, et al. 2003. Relation between oxidative stress, catecholamines, and impaired chronotropic response to exercise in patients with chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 92:215-218.
17. Prajda N, Weber G. 1975. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett.* 59:245-249.
18. Jonsson J, Klemm S, Tunny T, Stowasser M, Gordon R. 1995. A new genetic test for familial hyperaldosteronism type I aids in the detection of curable hypertension. *Biochem Bioph Res Comm.* 207:565-571.
19. Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. 2006. *Eur Resp J*28(1): 219-242.).
20. Berry C, Hare J. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanism and pathophysiological implications.2004.*J Physiol.* 555(3):589-606).
21. Kameda K, Matsunaga T, Abe N, Hanada H, Ishizaka H, Ono H, Saitoh M, Fukui K, Fukuda I, Osanai T, Okumura K. 2003. Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. *Eur Heart J.* 24:2180-2185.