

ANEXOS

ANEXO 1

Relationship between ADD1 Gly460Trp gene polymorphism and essential hypertension in Madeira Island

AQ1 Ana Célia Sousa^{a,*}, Roberto Palma dos Reis^b, Andreia Pereira^a, Sofia Borges^a, Ana Isabel Freitas^a, Graça Guerra^a, Teresa Góis^a, Mariana Rodrigues^a, Eva Henriques^a, Sónia Freitas^a, Ilídio Omelas^a, Décio Pereira^a, António Brehm^c, Maria Isabel Mendonça^a

Abstract

Essential hypertension (EH) is a complex disease in which physiological, environmental, and genetic factors are involved in its genesis. The genetic variant of the alpha-adducin gene (ADD1) has been described as a risk factor for EH, but with controversial results. The objective of this study was to evaluate the association of ADD1 (Gly460Trp) gene polymorphism with the EH risk in a population from Madeira Island.

A case-control study with 1614 individuals of Caucasian origin was performed, including 817 individuals with EH and 797 controls. Cases and controls were matched for sex and age, by frequency-matching method. All participants collected blood for biochemical and genotypic analysis for the Gly460Trp polymorphism. We further investigated which variables were independently associated to EH, and, consequently, analyzed their interactions.

In our study, we found a significant association between the ADD1 gene polymorphism and EH (odds ratio 2.484, $P = .01$). This association remained statistically significant after the multivariate analysis (odds ratio 2.548, $P = .02$).

The ADD1 Gly460Trp gene polymorphism is significantly and independently associated with EH risk in our population. The knowledge of genetic polymorphisms associated with EH is of paramount importance because it leads to a better understanding of the etiology and pathophysiology of this pathology.

Abbreviations: ADD1 = alpha-adducin gene, BMI = body mass index, CI = confidence interval, DBP = diastolic blood pressure, EH = essential hypertension, GENHYMAPE = Genes and Hypertension in Madeira, Gly = glycine, HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol, MDR = multifactorial dimensionality reduction, OR = odds ratio, PCR = polymerase chain reaction, SBP = systolic blood pressure, Trp = tryptophan.

Keywords: ADD1 Gly460Trp gene polymorphism, case-control study, essential hypertension

1. Introduction

Essential hypertension (EH) affects one-quarter of adults worldwide, and is estimated to increase to one-third by 2025.^[1] Its overall prevalence in the Portuguese adult population is about 42%, of which 44.4% is in men and 40.2% in women.^[2]

Editor: Leonardo Beyer.

Funding: This study was supported by the European Regional Development Fund's Operational Programme for the Enhancement of Economic Potential and Territorial Cohesion for the Autonomous Region of Madeira (INTERVIR+).

The authors report no conflicts of interest.

^aFunchal Hospital Center, Research Unit, Avenida Luís de Camões, nº 57, Funchal, Madeira, ^bFaculty of Medical Sciences, New University of Lisbon, Campo dos Mártires da Pátria, Lisboa, ^cLaboratory of Human Genetics, Madeira University, Campus da Pórtuguesa, Funchal-Madeira, Portugal.

AQ3 *Correspondence: Ana Célia Sousa, Funchal Hospital Center, Funchal, Portugal (e-mail: dep.card@assam.pt).

Copyright © 2017 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Medicine (2017) VolNo

Received: 5 January 2017 / Received in final form: 25 July 2017 / Accepted: 30 July 2017

<http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000007861>

Several meta-analyses have demonstrated consistently and linearly that elevated blood pressure (BP) is a powerful risk factor for cardiovascular disease and progression to renal failure, independently of other vascular risk factors. Persistently high BP values lead to cardiac, vascular, and renal disease.^[3,4]

Essential hypertension is a complex and multifactorial disorder resulting from environmental and genetic factors, and their interactions.^[5] Epidemiological studies have shown that 20% to 40% of BP variation is genetically determined.^[6,7] In the last decades, many efforts have been made to clarify the pathophysiological mechanisms of hypertension.

Several genetic variants have been studied and associated with the development of EH.^[8] However, the molecular genetics of EH remains unclear.

Cusi et al.^[9] first described a genetic variant at alpha-adducin (ADD1) gene level, which resulted from a glycine (Gly) to tryptophan (Trp) substitution at amino acid position 460 (Gly460Trp).^[9] This genetic variant Gly460Trp modulates the overall ability of tubular epithelial cells to transport ions, leading to an increased Na⁺/K⁺-ATPase pump activity and thus to a greater sodium reabsorption at the proximal renal tubule, increasing, consequently, the BP.^[9-11]

The association of this genetic variant with hypertension was confirmed in some studies,^[12-15] but not in others.^[16-19]

The purpose of this study was to evaluate the association between the ADD1 Gly460Trp polymorphism and EH in a

cohort from Madeira Island. The identification of these causal and/or associated variants promotes the development of approaches for EH prediction and prevention.

2. Material and methods

2.1. Study population

All individuals were selected from Genes and Hypertension in Madeira (GENHYMAPE) study,^[20] an ongoing Madeira population-based study which started in 2006, and consists of adults aged 30 to 75 years. It is a hospital-based case-control study, with patients enrolled from Cardiology consultations and controls selected from the Internal Medicine, on condition that they were normotensive and matched for sex and age.

Its purpose is to identify determinants of essential hypertension in Madeira Island (Portugal). This Island is located on the African plate, in the Atlantic Ocean, between 30° and 33° north latitude, 978 km southwest of Lisbon, about 700 km west of the African coast.

Participants of this study include native inhabitants and residents in Madeira Island for at least 3 generations with no migration history, from both rural and urban origins. This population is considered a genetically fairly homogeneous South European Caucasian population.

2.2. Study design

This case-control study was performed with a total of 1614 individuals with a mean age of 50.6 ± 8.2 years (50.1% male), namely 817 patients diagnosed with EH (mean age 50.8 ± 8.1 years; 51.5% male) and 797 normotensive controls (mean age of 50.4 ± 8.3 years; 48.6% male).

This study was approved by the ethics committee of the Funchal Hospital Center, and was performed in conformity with the guidelines outlined in the Declaration of Helsinki statement. Written informed consent was obtained from each participant, including explicit permission for the DNA analyses and the collection of relevant clinical data.

2.3. Data collection

Data were collected from all subjects in a standardized file comprising demographic, clinical characteristics, and traditional risk factors (sex, age, sedentary lifestyle, smoking and alcohol habits, body mass index [BMI], diabetes, and dyslipidemia). The definition of the traditional risk factors was based on the standard criteria, as previously reported.^[21–24]

Sedentary lifestyle was considered when individuals practiced less than 150 min/wk of moderate activity.^[21] Alcohol consumption was considered as a risk factor when individuals consumed 70 g of alcohol per week for more than 1 year. "Smoking status" refers to current smokers or subjects with less than 5 years of smoking cessation.^[21] BMI was defined as body mass divided by the square of the body height, universally expressed in units of kg/m², with obesity defined as a BMI ≥ 30 .^[22]

Subjects were classified as being diabetic when taking oral antidiabetic medication or insulin, or if their fasting plasma glucose was higher than 7.0 mmol/L or 126 mg/dL.^[23]

2.4. Definition of essential hypertension

Blood pressure was measured by an Internal Medicine specialist, after 10 minutes of resting, in the right arm, using a standard

Welch Allyn sphygmomanometer (phases I through V). The average of 3 readings taken 2 minutes apart was recorded.^[23]

Essential hypertension was considered when patients, at the entry into this study, were already diagnosed and/or had been on antihypertensive medication for more than 3 months or newly diagnosed hypertensives with systolic BP (SBP)/diastolic BP (DBP) $\geq 140/90$ mm Hg measured on at least 3 occasions.^[25]

The normotensive controls had never been treated with antihypertensive medications, and presented with SBP/DBP $< 140/90$ mm Hg. In addition, subjects with secondary hypertension, pregnant and lactating females, and those receiving medications for other indications that could affect BP were excluded from this study. Participants with multiple organ failure, a mental disorder, or chronic inflammatory disease were also excluded from this study.

2.5. Biochemical analyses

Blood samples were extracted after 14 to 16 hours of fasting. Biochemical analyses were performed in the Central Laboratory of the Hospital, according to the usual techniques.

To determine total cholesterol and triglycerides, blood samples were placed in dry tubes and centrifuged half an hour later at 3500g, and subsequently quantified by an enzymatic technique using a Hitachi 911 auto analyzer.

2.6. Genotype analysis

Genomic DNA was extracted from 80 µL of peripheral blood using a standard phenol-chloroform method. To identify ADD1 genotypes, a TaqMan allelic discrimination assay was performed using labelled probes and primers pre-established by the supplier (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems).

The genotyping reaction was amplified and detected on an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, and genotypes were determined by using the 7300 System SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA) without any prior knowledge of individual clinical data.

2.7. Statistical analysis

Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for genotypes at individual locus was assessed using the chi-square test. Comparisons of characteristics between cases and controls were analyzed by chi-square test for categorical variables and Student *t* test or Mann-Whitney *U* test for continuous variables, as appropriate. No missing data were observed.

The case-control matching procedure was based upon the distributions of the characteristics among the cases, named "frequency-matching."

Genotypic frequencies were determined from observed counts and compared by chi-square analysis. Three statistical genetic models were tested, namely additive (distribution of Trp allelic frequency of ADD1), recessive (TrpTrp vs GlyGly+GlyTrp), and dominant (GlyGly vs GlyTrp+ TrpTrp). The odds ratio (OR) and corresponding 95% confidence interval (CI) were determined.

A multivariate logistic regression model was performed using forward Wald method to examine associations between ADD1 genotypes and to account for significant risk factors as described (sex, age, smoking status, alcohol consumption, BMI, diabetes, sedentary lifestyle). The environmental risk factors were further studied for their interaction with ADD1 polymorphism by using multifactorial dimensionality reduction (MDR) 3.0.2 software.

Table 1
Baseline characteristics of study subjects.

Variables	Total (N=1614)	Hypertensives (n=817)	Controls (n=797)	P
Male sex, n (%)	808 (50.1)	421 (51.5)	387 (48.6)	.252
Age, y	50.6 ± 8.2	50.8 ± 8.1	50.4 ± 8.3	.252
SBP, mm Hg	134.7 ± 20.4	148.1 ± 18.6	121 ± 10.8	<.001
DBP, mm Hg	84.7 ± 12	91.6 ± 11.8	77.7 ± 7.4	<.001
BMI, kg/m ²	27.8 ± 4.9	29.3 ± 5.2	26.2 ± 4	<.001
Sedentary lifestyle, n (%)	681 (54.6)	460 (56.3)	421 (52.8)	.16
Alcohol consumption, n (%)	626 (38.8)	340 (41.6)	286 (35.9)	.02
Smoking status, n (%)	320 (19.8)	135 (16.5)	185 (23.2)	<.001
Diabetes, n (%)	169 (10.5)	133 (16.3)	36 (4.5)	<.001
Dyslipidemia, n (%)	1336 (82.8)	715 (87.5)	621 (77.9)	<.001
Total cholesterol, mg/dL	207 (107–370)	209 (115–344)	206 (107–370)	.08
HDL-C, mg/dL	48 (17.2–111.7)	46.9 (17.2–103)	49 (20.8–111.7)	<.001
LDL-C, mg/dL	131.1 (37.7–269)	131.1 (37.7–269)	131 (42–260)	.94
Triglycerides, mg/dL	110 (21–1098)	122 (31–1098)	98 (21–688)	<.001
Fasting glucose, mg/dL	95 (66–364)	98 (70–360)	93 (66–364)	<.001

Statistically significant for $P < .05$.

BMI = body mass index, DBP = diastolic blood pressure, HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol, SBP = systolic blood pressure.

The best combination pattern was searched on the principle that both cross-validation consistency and test balance accuracy were maximized to evaluate the interaction of the genetic polymorphism with the environmental risk factors, in relation to EH.

Statistical analysis was done using SPSS software version 19.0 (IBM, Armonk, NY) and R version 3.2.0. P value $< .05$ was used as the level of significance.

3. Results

3.1. Baseline characteristics of the population

The baseline characteristics of the study subjects are shown in Table 1. This study included a total of 1614 individuals, namely 817 patients diagnosed with EH and 797 normotensive controls. The case-control matching procedure was based upon the “frequency-matching.” Specifically, using chi-square test, we obtained a male frequency of 51.5% for cases and 48.6% for controls, without statistical significance ($P > .05$), meaning that no significant differences exist between the 2 groups. Additionally, using Student t test, we obtained a mean ($\pm$ SD) age of 50.8 ($\pm$ 8.1) years for cases and 50.4 ($\pm$ 8.3) years for controls, without statistical significance ($P > .05$), showing that the variable age is correctly adjusted for cases and controls (Table 1).

Sedentary lifestyle, total cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) showed no significant differences between cases and controls (all $P > .05$). However, SBP and DBP, BMI, alcohol consumption, diabetes, dyslipidemia, triglycerides, and fasting glucose were significantly higher in the hypertensive group than in controls ($P < .05$).

Smoking and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were higher in the control group, with statistical significance ($P = .001$ and $P < .001$, respectively) (Table 1).

3.2. Genotype distribution of ADD1 (Gly460Trp) gene polymorphism among cases and controls, and EH risk

The genotype distributions of ADD1 are shown in Table 2. In our population, genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > .05$). The wild genotype (GlyGly) was more prevalent in controls than in cases (71.8% vs 70.1%). On the contrary, the mutated genotype (TrpTrp) was more frequent in cases than in controls (3.1% vs 1.2%) with statistical significance ($P = .01$) (Table 2).

Risk prediction was evaluated under 3 genetic models of inheritance (Table 2). The alpha-adducin Gly460Trp gene polymorphism showed a statistical significant increase in EH risk, under the recessive genetic model (odds ratio [OR] 2.484, 95% confidence interval [CI] 1.185–5.207, $P = .01$). No significant association was found using a dominant genetic model (OR 1.083, 95% CI 0.873–1.342, $P = .47$) or additive model (OR 1.143, 95% CI 0.943–1.386, $P = .17$) (Table 2).

A multivariate analysis (logistic regression) was performed to determine which variables were independently associated with EH risk (Table 3). ADD1 Trp/Trp genotype remained in the equation as a significant and independent risk factor for EH (OR 2.548, 95% CI 1.159–5.601, $P = .02$). Additionally, diabetes, alcohol consumption, and BMI were also significantly associated with EH risk (Table 3). Remarkably, smoking habits appeared in the equation as a significant protective variable to EH development (Table 3).

Table 2
Genotype distribution of ADD1 gene polymorphism among hypertensive subjects and controls and essential hypertension risk.

ADD1 Gly460Trp	Cases (n=817)	Controls (n=797)	Models (OR, 95% CI)		
			Dominant	Recessive	Additive
GlyGly, n (%)	573 (70.1)	572 (71.8)	1.083	2.484	1.143
GlyTrp, n (%)	219 (26.8)	215 (27)	(0.873–1.342)	(1.185–5.207)	(0.943–1.386)
TrpTrp, n (%)	25 (3.1)	10 (1.2)	$P = .47$	$P = .01$	$P = .17$

Statistically significant for $P < .05$.

ADD1 = alpha-adducin gene, CI = confidence interval, Gly = glycine, OR = odds ratio from the genetic risk models, with the recessive (in italics) showing the best results, Trp = tyrosine.

Table 3
Logistic regression analysis with variables independently associated with essential hypertension.

Variables	Odds ratio (95% CI)	P
Diabetes	3.028 (2.026–4.526)	<.001
Alcohol consumption	1.238 (.996–1.538)	.05
BMI	1.163 (1.132–1.195)	<.001
Smoking status	.713 (.544–0.935)	.01
ADD1		.06
ADD1 (Gly/Trp)	.965 (.761–1.225)	.77
ADD1 (Trp/Trp)	2.548 (1.159–5.601)	.02
		0

Method forward Wald SPSS version 19.0.

ADD1=alpha-adducin gene, BMI=body mass index, CI=confidence interval, Gly=glycine, Trp=tryptophan.

Not retained in the equation: age, sex, and sedentary lifestyle.

Statistically significant for $P < .05$.

The MDR software was finally employed to analyze the interaction between the nongenetic variables and the ADD1 polymorphism (Table 4). The best association model included diabetes, BMI, and ADD1 polymorphism, which showed a maximal testing accuracy of 0.641 and a cross-validation consistency of 10 out of 10 (Table 4). These results indicate that ADD1 interacts with diabetes and BMI in a synergistic way, with a 3.77-fold greater risk of EH (Table 4).

4. Discussion

In our population from Madeira Island, subjects who were carriers of the mutated ADD1 Trp460Trp genotype had an increased risk of EH. This association was further strengthened in the multivariate analysis, reinforcing the importance of this variant in the susceptibility to EH in our population. Cusi et al^[27] published the first Caucasian study that has proved a significant linkage between ADD1 Gly460Trp gene polymorphism and EH. Similar results have also been found in others ethnicities, such as Asians^[12,15] and Africans.^[14] Nevertheless, the association of the ADD1 polymorphism with the susceptibility to EH was not always clearly demonstrated.^[14–19,26] The lack of association did not exclude the involvement of this genetic variant with renal sodium-handling abnormalities.

The ADD1 polymorphism results in the amino acid substitution of glycine by tryptophan (Gly460Trp), which is reported to be associated with a salt sensitive form of hypertension patients.

Manunta et al^[14] have studied the involvement of ADD1 polymorphism in abnormalities of renal function in hypertensive patients, and have concluded that the fraction of excretions of

lithium and uric acid, markers of proximal renal tubular function, was reduced in patients with the alpha-adducin variant TrpTrp. This supports the hypothesis that this variant is related to an increase in proximal Na⁺ reabsorption at the kidney level^[14] by an increase in the Na⁺ pump activity and a higher number of Na⁺ pump units expressed on the cell surface.^[27]

Cusi et al^[9] exposed hypertensive subjects to an acute salt sensitivity test and investigated the effect of ADD1 polymorphism on the response of acute BP to sodium changes. Authors concluded that heterozygotes (Gly460Trp) had a greater decrease in BP and significantly lower plasma renin activity than homozygotes (Gly460Gly).^[9]

This leads us to conclude that alpha-adducin 460Trp polymorphism is associated with an increase in BP, not in all hypertensive individuals,^[14] but in the specific hypertensive phenotype—salt-sensitive and low renin hypertension.

Other investigators have found decreased renin activity levels in subjects carrying the 460Trp allele.^[12,28]

Grant et al^[29] showed that this genetic variant modifies sodium homeostasis and associates with intermediate phenotypes of salt sensitivity and low renin hypertension. This may be explained by the fact that a deficient alpha-adducin function leads to increased tubular sodium reabsorption, producing sodium retention and intravascular volume expansion with suppression of plasma renin activity.^[29]

The genetic variance of 1 or more of these genes may justify the increased salt sensitivity of some individuals; hence the importance of their knowledge to individualize EH control and therapeutic measures.

In addition to ADD1 Trp460Trp genotype, other variables such as BMI, alcohol habits and diabetes remained in the equation as independent risk factors of EH. According to our results, smoking status appeared to be a protective factor. A likely explanation of these apparent protective effects of smoking on hypertension might be related to the fact that hypertensive patients are most likely to have been advised by their physicians to quit smoking, so that the proportion of smoking hypertensives is lower than the proportion of nonsmoking ones. MDR analyses further showed the interaction between ADD1 polymorphism, BMI, and diabetes as the best model for EH susceptibility. Since BMI plays a key role in development of high BP and ADD1 is 1 of the most important targets for salt sensitivity and expanded plasma volume, it is not surprising that their interaction may play an important role in the susceptibility to hypertension. On the contrary, it is now established that insulin resistance, which predicts type 2 diabetes, also has a role in the development of hypertension.^[10] In deed, hypertension and diabetes substantially share common pathways such as obesity, inflammation, oxidative stress, insulin resistance, and mental stress.

Table 4
Best models to analyze gene-environment interactions by multifactor dimensionality reduction.

Best model	Training balanced accuracy	Training odds ratio	Training P	Testing balanced accuracy	Testing odds ratio	Testing P	Cross validation consistency
BMI	0.622	3.71 (2.68–4.77)	<.001	0.622	3.71 (1.73–7.92)	.0005	10/10
Diabetes; BMI	0.638	3.76 (2.96–4.76)	<.001	0.638	3.76 (1.84–7.66)	.0002	10/10
Diabetes; BMI; ADD1*	0.641	3.77 (2.96–4.77)	<.001	0.641	3.77 (1.87–7.62)	.0001	10/10
Diabetes; BMI; smoking; ADD1	0.642	3.96 (3.12–5.03)	<.001	0.629	3.44 (1.70–7)	.0005	8/10

Statistically significant for $P < .05$.

ADD1=alpha-adducin gene, BMI=body mass index.

* Overall best combination model with highest training balanced accuracy, highest testing accuracy, and best cross-validation CV consistency.

Essential hypertension is a multifactorial disease caused by environmental, genetic, and individual lifestyle interactions that lead to the onset of this pathology. Further studies are needed to study gene-gene and gene-environment interactions and/or the diversity of individual genetic and environmental characteristics that lead to the development of EH.

4.1. Study strengths and limitations

We must point out that this is the first study done with a population from Madeira Island, a genetically homogenous and isolated Southern European population. This has been especially valuable for mapping rare recessive disorders, but many researchers believe this could be a solution for more complex disorders as well because of the relatively uniform genetic background of the population. Some culturally and genetically isolated populations have a more similar way of living, eating habits, and natural environment, which reduce environmental variation.^[31]

A significant limitation of the study is the lack of biochemical data on plasma renin, salt intake, and salt sensitivity, and other confounders such as stress/anxiety levels and insomnia to explain the specific physiological role of alpha-adducin polymorphism in our population.

Another limitation is that hypertensives are included in the study after their diagnosis and are already taking antihypertensive therapy, for ethical reasons. In this study, only 38 hypertensive individuals were not medicated, which limits the baseline BP assessment of individuals with and without this genetic variant. It would be very interesting to measure the impact of gene polymorphisms in relation to SBP and DBP.

5. Conclusions

In summary, the present study shows that the ADD1 Gly460Trp gene polymorphism is independently and significantly associated with the EH risk amongst Madeira Island's population. The knowledge of the genetic polymorphisms associated with EH could be widely used in clinical practice for diagnosis, treatment, and prognosis of patients with essential hypertension.

Acknowledgment

We are very grateful to Elsa Sousa who made all the administrative procedures.

References

- [1] Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005;365:217-23.
- [2] Polonia J, Martins L, Pinto F, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: changes over a decade. The PHYSA study. *J Hypertens* 2014;32:1211-21.
- [3] National Heart, Lung and Blood Institute. Factbook Fiscal Year 1966. Bethesda, Md: NIH; 1996.
- [4] Lewington S, Clarke P, Qizilbash N, et al. 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.
- [5] O'Shaughnessy KM. The genetics of essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:5-11.
- [6] Gong M, Hubner N. Molecular genetics of human hypertension. *Clin Sci* 2006;110:315-26.
- [7] Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996;272:676-80.
- [8] Doris PA. Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease common variant hypothesis. *Hypertension* 2002;39:323-31.
- [9] Cusi D, Barlassina C, Azzani T, et al. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* 1997;349:1353-7.
- [10] Beeks E, Van Der Klauw MM, Kroon AA, et al. Alpha-Adducin Gly460Trp polymorphism and renal hemodynamics in essential hypertension. *Hypertension* 2004;44:419-23.
- [11] Manunta P, Burnier M, D'Amico M, et al. Adducin polymorphism affects renal proximal tubule reabsorption in hypertension. *Hypertension* 1999;33:694-7.
- [12] Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, et al. Polymorphism of alpha-adducin in Japanese patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 1998;21:29-32.
- [13] Casari G, Barlassina C, Cusi D. Association of the alpha-adducin locus with essential hypertension. *Hypertension* 1995;25:320-6.
- [14] Barlassina C, Norton GR, Samani NJ, et al. Alpha-adducin polymorphism in hypertensives of South African ancestry. *Am J Hypertens* 2000;13:719-23.
- [15] Ju Z, Zhang H, Sun K, et al. Alpha-adducin gene polymorphism is associated with essential hypertension in Chinese: a case-control and family-based study. *J Hypertens* 2003;21:1861-8.
- [16] Ishikawa K, Katsura T, Sato N, et al. No association between alpha-adducin 460 polymorphism and essential hypertension in a Japanese population. *Am J Hypertens* 1998;11:502-6.
- [17] Kato N, Sugiyama T, Nabika T, et al. Lack of association between the alpha-adducin locus and essential hypertension in a Japanese population. *Hypertension* 1998;31:730-3.
- [18] Larson N, Hutchinson R, Boerwinkle E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension* 2000;35:1297-300.
- [19] He X, Zhu DL, Chu SL, et al. α -Adducin gene and essential hypertension in China. *Clin Exp Hypertens* 2001;23:579-89.
- [20] Caldeira H, Jesus H, Mendonça L, et al. Plano Regional de ID+T para o período 2014/20. Pánel de Saúde 2012; Available at: <http://pdi.ardis.pt/wp-content/uploads/2012/08/PDIT-Saude-20121120.pdf>.
- [21] 2016 European Guidelines on Cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J* 2016; 37:2315-2381.
- [22] National Institute of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. North American Association for the Study of Obesity. The Practical Guide: Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. NHLBI Obesity Education Initiative, NHL Publication Number: 00-4084; 2000.
- [23] Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26:3160-3167.
- [24] Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-2497.
- [25] 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 2003; 21:1011-1053.
- [26] Liao X, Wang W, Zeng Z, et al. Association of alpha ADD1 gene and hypertension risk: a meta-analysis. *Med Sci Monit* 2015;21:1634-41.
- [27] Tripodi G, Valtorta F, Torielli L, et al. Hypertension associated point mutation in the adducin a and b subunit affect actin cytoskeleton and ion transport. *J Clin Invest* 1996;97:2815-22.
- [28] Manunta P, Cusi D, Barlassina C, et al. Alpha-adducin polymorphisms and renal sodium handling in essential hypertensive patients. *Kidney Int* 1998;53:1471-8.
- [29] Grant PD, Romero JR, Jeunemaitre X, et al. Low-renin hypertension, altered sodium homeostasis, and an alpha-adducin polymorphism. *Hypertension* 2002;39:191-6.
- [30] Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1597-1602.
- [31] Jorde LB, Wooding SP. Genetic variation, classification and "race". *Nat genet* 2004;36(11 suppl):S28-33.

MD**MEDICINE**

Manuscript No. MD-D-17-00092

Dear Author,

During the preparation of your manuscript for typesetting, some queries have arisen. These are listed below. Please check your typeset proof carefully and mark any corrections in the margin as neatly as possible or compile them as a separate list. This form should then be returned with your marked proof/list of corrections to the Production Editor.

QUERIES: to be answered by AUTHOR/EDITOR?

QUERY NO.	QUERY DETAILS	RESPONSE
<AQ1>	Please provide academic degrees (e.g., MD, PhD, BS) for all the authors. Roles (e.g., professor, resident, faculty) are not required for this journal, but degrees must be present for each author.	
<AQ2>	Please confirm whether surnames/family names (red) have been identified correctly in the author byline.	
<AQ3>	Please check the affiliations for correctness.	
<AQ4>	Please check correspondence details for appropriateness.	
<AQ5>	The author name 'Manunta et al' does not match with the reference citation [16]. Please check.	
<AQ6>	As per journal style stipulated by the publisher, references must appear in sequential order in the text (including those cited in table and figure legends, i.e., at the first citation of Table 1, Table 2, Fig. 1, etc.). This has been carried out in this article. Please check.	
<AQ7>	Please check and provide, if possible, the accession date of the following reference: 20.	

ANEXO 2

AU1 ▶

Synergistic Association of Genetic Variants with Environmental Risk Factors in Susceptibility to Essential Hypertension

AU2 ▶

Ana Célia Sousa,¹ Maria I. Mendonça,¹ Andreia Pereira,¹ Sara Gouveia,¹ Ana I. Freitas,^{1,2}
Graça Guerra,^{1,2} Mariana Rodrigues,¹ Eva Henriques,¹ Sónia Freitas,¹ Sofia Borges,¹
Décio Pereira,¹ António Brehm,² and Roberto Palma dos Reis³

AU4 ▶ Essential hypertension (EH) is a complex and multifactorial disease resulting from multiple environmental and genetic factors.

Aims: Evaluate the interaction model between genetic variants and environmental risk factors that most potentiate the EH development.**Methods:** We performed a case-control study with 1641 participants (mean age 50.6 ± 8.1 years), specifically 848 patients with EH and 793 controls, adjusted for gender and age. Traditional risk factors, biochemical and genetic parameters, including the genotypic discrimination of 14 genetic variants previously associated with EH, were investigated. Multifactorial dimensionality reduction (MDR) software was used to analyze gene-environment interactions. To validate this, a logistic regression analysis was performed with environmental risk factors, significant genetic variants, and the best MDR model.**Results:** The best model indicates that the interaction between ADD1 rs4961 640T allele, diabetes, and obesity (body mass index ≥30) may increase approximately four-fold the risk of EH (odds ratio = 3.725; 95% confidence interval: 2.945–4.711; $p < 0.0001$).**Conclusion:** This work showed that the interaction between ADD1 rs4961 variant, obesity, and the presence of diabetes increased about four times the susceptibility to EH onset. In these circumstances, lifestyle adjustment and diabetes control should be intensified in patients who carry the ADD1 variant.**Keywords:** Genes, ADD1, environmental risk factors, obesity, MDR software, diabetes

Introduction

AU5 ▶ ESSENTIAL HYPERTENSION (EH) is a complex and multifactorial disease resulting from multiple environmental and genetic factors (Carretero and Oparil, 2000; Kuneš and Zicha, 2009; Joseph *et al.*, 2013).Both clinical and experimental studies have already identified plausible mechanisms underlying the development of EH: increased activity of the sympathetic nervous system, overactivity of the renin-angiotensin aldosterone system, dysfunction of the vascular endothelium, thrombogenesis, and impairment of the pressure-natriuresis mechanism leading to salt retention and elevated peripheral resistance, among others (Oparil *et al.*, 2003). All these systems are under strict genetic control, and this is the cause that some individuals aremore susceptible to EH than others. The majority of currently available knowledge has greatly benefited by mapping the genes responsible for Mendelian forms of hyper- and hypotension (Lifton *et al.*, 2001) and studying rodent models with various blood pressure (BP) affecting phenotypes (Okamoto and Aoki, 1963; Cowley, 2006). These association studies have successfully identified multiple interacting molecular pathways that are involved in the determination of a subject's BP. Consequently, genes coding for the components of these molecular pathways have been targeted for the identification of genetic variations affecting interindividual differences in BP levels (Mein *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2008). However, results of a large number of association studies conducted with BP traits have been inconsistent. Genome-wide association studies (GWAS) have emerged as a novel alternative toAU3 ▶ ¹Unidade de Investigação, Hospital Doutor Nêlio Mendonça, Funchal, Portugal.
²Laboratório de Genética Humana, Universidade da Madeira, Funchal, Portugal.
³Faculty of Medical Sciences, New University of Lisbon, Lisbon, Portugal.

explore simultaneously a large number of genomic loci for associations with a phenotypic trait. This method has shown a great promise in determining common polymorphisms responsible for several complex phenotypes like diabetes, stroke, and coronary artery disease (Altshuler *et al.*, 2008). However, GWAS have not produced clear results in respect of hypertension-associated gene polymorphisms (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007; Levy *et al.*, 2007; Ehret *et al.*, 2008). Although it has identified numerous loci associated with BP traits (Levy *et al.*, 2009), they only explain a small proportion of interindividual BP variability. The 29 loci identified by GWAS and reported by the International Consortium of Blood Pressure accounts for about 1% of BP variation in the general population (Ehret *et al.*, 2011).

Knowing the universal nature of epistasis in determining susceptibility to complex disease, one possible way to approach these complex conditions is to examine the joint impact of multiple genes involved in particular cellular or physiological pathways along with several environmental risk factors underlying it. Moreover, many clinical and experimental studies have bypassed important environmental factors that can affect BP development and progression (Zuoguang *et al.*, 2013).

In these circumstances, in complex diseases, like EH, more than to evaluate the polymorphisms one by one, it is important to evaluate several polymorphisms together with environmental factors.

Objective

The goal of the current study is to evaluate the best interaction model between 14 single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated to EH and several environmental risk factors, in predicting the risk of EH in the population of Madeira Island (Portugal).

Methods

Study population

All subjects participating in the present study were selected from the Internal, General, and Familiar Medicine from our Hospital.

This study received approval from the ethics committee of the Funchal Hospital Center and was performed in conformity with the guidelines outlined in the Declaration of Helsinki statement. Written informed consent was obtained from each participant, including explicit permission for the DNA analyses and the collection of relevant clinical data.

Study design

A case-control study was performed with a cohort of 1641 individuals (50.6 ± 8.1 years; 49.9% male), namely 848 patients diagnosed with EH (mean age 50.8 ± 8.1 ; 51.8% male) and 793 normotensive controls (mean age of 50.3 ± 8.2 ; 47.9% male). Cases and controls were matched for sex and age.

EH was considered when patients, at the entry into this study, were already diagnosed and/or had been on antihypertensive medication for more than 3 months or newly diagnosed hypertensives with systolic blood pressure (SBP)/diastolic blood pressure (DBP) $\geq 140/90$ mmHg measured on at least three occasions (European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee,

2003). The normotensive controls had never been treated with antihypertensive medication and presented a SBP/DBP $< 140/90$ mmHg.

BP was measured after 10 min of resting in the right arm, using a standard Welch Allyn sphygmomanometer (phases I through V). The average of three readings taken 2 min apart was recorded (European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee, 2003).

Data collection

Data recorded from each subject comprised demographic, clinical profile, and traditional risk factors (gender, age, body mass index [BMI], sedentary lifestyle, alcohol and smoking habits, and diabetes).

BMI was defined as body mass divided by the square of the body height, universally expressed in units of kg/m^2 , with obesity defined as a BMI ≥ 30 (National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute North American Association for the Study of Obesity, 2000). Sedentary lifestyle was considered when individuals practiced < 150 min/week of moderate activity or 75 min of vigorous activity (The Department of Health, Government of Australia, 2014). Alcohol consumption was considered as a risk factor when individuals consumed 70 g of alcohol per week for more than 1 year. Moreover, individuals who smoked ≥ 270 cigarettes per week for more than 1 year were defined as "smokers" (Ji *et al.*, 2013). Subjects were classified as being diabetic when taking oral antidiabetic medication or insulin or if their fasting plasma glucose was higher than 7.0 mmol/L or 126 mg/dL (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

Biochemical analysis

Blood samples were extracted after 14–16 h fasting. Biochemical analyses were performed in the Central Laboratory of the Hospital, according to standard techniques. To determine total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein, triglycerides, and glucose, blood samples were placed in dry tubes, centrifuged half an hour later at 3500g and subsequently quantified by an enzymatic technique using a "AU 5400" (Beckman Coulter) auto analyzer. Biochemical markers such as lipoprotein-a, apolipoprotein B, and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) were quantified by immunoturbidimetry using an AU 5400 (Beckman Coulter) automatic system. To measure fibrinogen, samples were placed in a tube containing sodium citrate, and measurements were taken with an ACL TOP 700 automatic analyzer.

SNP selection

SNPs were selected either from GWAS or candidate gene association studies for loci biologically plausible to EH or BP, specifically: ACE rs4340, ACE rs4343, ATIR rs5186, AGT rs699, AGT rs4762, ADD1 rs4961, CYP11B2 rs1799998, CYP17A1 rs11191548, ADRB1 rs1801253, ADRB2 rs1042713, GNB3 rs5443, AT2B1 rs2681472, SLC4A2 rs2303934, and SCNN1G rs5718.

Entering criteria included genes with a minor allele frequency (MAF) $> 5\%$. Genes in Hardy-Weinberg disequilibrium ($p < 0.0036$, after Bonferroni correction) were automatically excluded.

GENES, ENVIRONMENTAL RISK FACTORS AND ESSENTIAL HYPERTENSION

3

Genetic analyses

Genetic analyses were done at the Human Genetics Laboratory of the University of Madeira. Genomic DNA was extracted from 80 µL of peripheral blood using a standard phenol-chloroform method. A TaqMan allelic discrimination assay for genotyping was performed using labeled probes and primers pre-established by the supplier (TaqMan SNP Genotyping Assays; Applied Biosystems).

Quality check of TaqMan genotyping technique was maintained by the inclusion of one nontemplate control in each plate of 96 wells. Also, all SNP TaqMan assays had blind duplicates accounting for 20% of all samples. Some SNP genotypes were randomly confirmed by conventional direct DNA sequencing, as 10–15% of all samples were reamplified for sequencing.

All reactions were done on an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System and genotypes were determined using the 7300 System SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA) without any prior knowledge of individual's clinical data.

Statistical analyses

Genotypic frequencies were determined from observed counts and compared by Chi-square analysis. Representative samples were judged by comparing the genetic polymorphism frequency and Hardy-Weinberg equilibrium was tested at each locus on a contingency table of observed versus predicted genotype using the Chi-squared test.

Continuous and categorical variables were compared between the two groups by the unpaired Student's *t*-test, Mann-Whitney, and the Chi-squared test when appropriate. A two-tailed *p* value of <5% was considered statistically significant, whereas a value of *P*_B (Bonferroni divided by total number of comparisons) was considered significant after the Bonferroni correction.

Five statistical genetic models were tested, namely dominant, recessive, additive, multiplicative, and codominant. The relative risk factor was evaluated using odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) for each model.

Interactions between variants significantly associated with EH and five environmental risk factors for EH (sedentary lifestyle, BMI, diabetes, smoking, and alcohol habits) were analyzed by using multifactorial dimensionality reduction (MDR) 3.0.2 software (Guy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). The best combination pattern was searched on the principle that both cross-validation consistency and test balance ac-

curacy were maximized to evaluate the interaction of the genetic polymorphism with each other and with the five environmental risk factors, in relation to EH.

To test the validity of MDR method, we further conducted a classical logistic regression analysis that included the five environmental risk factors and the best MDR model.

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences Software version 19.0 (IBM, Armonk, NY).

Results

Characteristics of the population

Baseline characteristics of our population are listed in Table 1. There were no significant differences between cases and controls in terms of age and sex. When compared with controls, patients with EH had higher alcohol consumption ($p=0.008$), BMI ($p<0.0001$), obesity ($p<0.0001$), diabetes ($p<0.0001$), SBP ($p<0.0001$), DBP ($p<0.0001$), and heart rate ($p<0.0001$) (Table 1). Controls had more smoking habits in relation to hypertensive subjects, with statistical significance ($p<0.0001$).

Biochemical analysis of the population is shown in Table 2. Comparatively to controls, hypertensive patients had significantly higher levels of hemoglobin ($p<0.0001$), leucocytes (<0.0001), fibrinogen (<0.0001), glucose (<0.0001), triglycerides (<0.0001), apolipoprotein B ($p<0.0001$), and hs-CRP (<0.0001). On the other hand, HDL cholesterol showed higher values in controls, with a $p<0.0001$ (Table 2).

Genetic polymorphisms and EH risk

Risk prediction of 14 polymorphisms related to EH was evaluated under five genetic models of inheritance. Table 3 shows the results obtained from the best genetic model for each SNP. All variants were in Hardy-Weinberg equilibrium (Table 3). However, SLC4A2 rs2303934 was excluded due its low MAF (3.2) (Table 3). The remaining 13 genetic variants were included for further analysis.

Only two showed a statistically significant increase in EH risk ($p<0.05$), namely, the ADD1 rs4961 variant in the recessive model (OR=2.379; 95% CI: 1.135–4.985; $p=0.018$) and the GNB3 rs5443 variant in the dominant model (OR=1.275; 95% CI: 1.042–1.559; $p=0.018$) (Table 3). Additionally, the ACE rs4343 was marginally significant being at the

TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF THE POPULATION

Variables	Total (n=1641)	Hypertensives (n=848)	Controls (n=793)	p Value
Age, years	50.6 ± 8.1	50.8 ± 8.1	50.3 ± 8.2	0.212
Male sex, n (%)	819 (49.9)	439 (51.8)	380 (47.9)	0.119
Sedentary life, n (%)	887 (54.1)	476 (56.1)	411 (51.8)	0.080
Alcohol, n (%)	627 (38.2)	350 (41.3)	277 (26.6)	0.008
Smoking, n (%)	375 (22.9)	164 (19.3)	211 (26.6)	<0.0001
BMI, kg/m ²	27.7 ± 4.9	29.2 ± 5.2	26.2 ± 4	<0.0001
Obesity, n (%)	441 (26.9)	326 (38.4)	115 (14.5)	<0.0001
Diabetes, n (%)	169 (10.3)	134 (15.8)	35 (4.4)	<0.0001
SBP, mmHg	134.4 ± 20.4	147.2 ± 18.9	120.7 ± 10.9	<0.0001
DBP, mmHg	84.5 ± 12.1	91.1 ± 11.7	77.4 ± 7.7	<0.0001
Heart rate, bpm	72.1 ± 11.8	73.1 ± 12.2	71 ± 11.2	<0.0001

Statistically significant for $p<0.05$.

BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; bpm, beats per minute.

TABLE 2. BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE POPULATION

Variables	Total (n= 1641)	Hypertensives (n= 848)	Controls (n= 793)	p Value
Hemoglobin, g/dL	14.3 (9.6–18.2)	14.4 (9.6–18.2)	14.2 (10.1–17.6)	<0.0001
Platelets, 10 ³ /μL	229 (23–664)	233 (23–664)	227 (65–544)	0.206
Leucocytes, 10 ³ /μL	6.4 (2.1–18)	6.6 (2.9–18)	6.2 (2.1–16.6)	<0.0001
Fibrinogen, mg/dL	362 (179.2–874)	371 (179.2–874)	355.3 (224–688)	<0.0001
Glucose, mg/dL	95 (66–364)	98 (70–360)	93 (66–364)	<0.0001
Lipoprotein (a), mg/dL	16.3 (0.6–236)	16.6 (0.6–236)	16.2 (0.8–198.2)	0.730
Cholesterol, mg/dL	207 (107–370)	208.5 (115–344)	206 (107–370)	0.193
HDL, mg/dL	48 (17.2–111.7)	46.9 (17.2–103)	49 (20.8–111.7)	<0.0001
LDL, mg/dL	131 (37.7–269)	131 (37.7–269)	131 (42–260)	0.944
Triglycerides, mg/dL	110 (21–1098)	119 (29–1098)	99 (21–688)	<0.0001
Apolipoprotein B, mg/dL	104 (3.9–232)	106.6 (5.1–205)	99.7 (3.9–232)	<0.0001
hs-CRP, mg/dL	0.22 (0.01–18.51)	0.25 (0.02–13.1)	0.19 (0.01–18.51)	<0.0001

Biochemical variables are presented by median (minimum–maximum).

Statistically significant for $p < 0.05$.

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein.

threshold of significance ($p = 0.053$) with an OR of 1.148 (95% CI: 0.999–1.321) (Table 3).

Gene–environment interactions and the EH risk

MDR software was employed to analyze the interaction between the three mentioned variants (ADD1 rs4961, GNB3 rs5443, and ACE rs4343) and five nongenetic risk factors for EH (sedentary lifestyle, obesity, diabetes, smoking, and alcohol habits) (Table 4). The best association model included diabetes, obesity, and ADD1 rs4961 polymorphism, which showed a maximal testing accuracy of 0.638 and a crossvalidation consistency of 10 out of 10 (Table 4). These results indicate that ADD1 rs4961 interacts with diabetes and obesity in a synergistic way with a 3.725-fold greater risk of EH (Table 4). Consequently this model was chosen as the overall best MDR model, which

was significant at a level of 0.0002, indicating overall a better performance by 2 out of 10,000 permutations and was thus unlikely under the null hypothesis of null association.

To test the validity of the MDR method, we further conducted a logistic regression analysis that combined the two individually significant polymorphisms rs4961 and rs4343, the confounding factors (sedentary lifestyle, smoking, and alcohol habits), and the best interaction MDR model (diabetes, obesity, and ADD1 rs4961) (Table 5). The results confirmed that the interaction between diabetes, obesity, and ADD1 rs4961 showed a significant association of 10-fold increased EH risk (95% CI: 2.336–43184; $p = 0.002$) (Table 5). Furthermore, sedentary lifestyle and alcohol presented a risk for EH of 1.229 and 1.390, respectively, with statistical significance ($p < 0.05$). Smoking appeared with a protective effect for EH (OR = 0.615 95% CI 0.485–0.780; $p < 0.0001$).

TABLE 3. RISK PREDICTION OF FOURTEEN POLYMORPHISMS RELATED TO ESSENTIAL HYPERTENSION IN OUR POPULATION (N=1641), SELECTED FROM THE BEST GENETIC MODEL OF INHERITANCE

Gene	SNP	Chr	Position	Cases	Controls	OR* (95% CI)	p Value	MAF (%)	p Value HW
ACE I/D	rs4340	17	61,565,892	65.7	62.8	1.137 (0.985–1.312) ^b	0.079 ^b	34.3	0.110
ACE 2350 A/G	rs4343	17	63,488,670	58.4	55.1	1.148 (0.999–1.321) ^c	0.053 ^c	41.6	0.721
AGT T/M (T174M)	rs4762	1	230,710,231	30.7	29.6	1.198 (0.941–1.525) ^d	0.143 ^d	30.7	0.790
AGT M/T (M235T)	rs699	1	230,710,048	43.5	42.1	1.117 (0.909–1.373) ^d	0.291 ^d	43.5	0.766
AT1R A/C	rs5186	3	148,742,201	24.8	24.0	1.094 (0.900–1.331) ^d	0.366 ^d	24.8	0.097
CYP11B2 C/T	rs1799998	8	142,918,184	55.5	55.5	0.927 (0.724–1.187) ^d	0.548 ^d	44.5	0.823
CYP17A1 T/C	rs11191548	10	103,086,421	10.7	10.3	1.150 (0.473–2.794) ^e	0.757 ^e	10.7	0.629
ADD1 G/T	rs4961	4	2,904,980	16.3	14.7	2.379 (1.135–4.985) ^f	0.018 ^f	16.3	0.550
GNB3 C/T	rs5443	12	6,845,711	40.7	38.3	1.275 (1.042–1.559) ^d	0.018 ^d	40.7	0.140
ADRB1 R/G (R389G)	rs1801253	10	114,045,297	30.7	29.6	1.089 (0.897–1.322) ^d	0.387 ^d	30.7	0.213
ADRB2 R/G (R16G)	rs1042713	5	148,826,877	55.8	57.8	0.925 (0.805–1.062) ^d	0.268 ^d	44.2	0.716
SCNN1G A/G	rs5718	16	23,182,544	56.8	55.7	1.170 (0.926–1.478) ^d	0.187 ^d	43.2	0.014
SLC4A2 C/T	rs2303934	7	150,767,540	3.2	2.8	1.168 (0.769–1.775) ^d	0.467 ^d	3.2	0.021
ATP2B1 A/G	rs2681472	12	89,615,182	15.3	15.1	0.780 (0.433–1.405) ^f	0.407 ^f	15.3	0.745

*OR from the best model.

^bMultiplicative model.

^cAdditive model.

^dDominant model.

^eCodominant model.

^fRecessive model.

OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism; Chr, chromosome; MAF, minor allele frequency; HW, Hardy–Weinberg using $p < 0.004$ after Bonferroni correction; CI, confidence interval.

GENES, ENVIRONMENTAL RISK FACTORS AND ESSENTIAL HYPERTENSION

5

TABLE 4. BEST MODELS TO ANALYZE GENE-ENVIRONMENT INTERACTIONS BY MULTIFACTORIAL DIMENSIONALITY REDUCTION

Best model	Training balanced accuracy	Training odds ratio	Training p-value	Testing balanced accuracy	Testing odds ratio	Testing p-value	CV consistency
Obesity	0.620	3.682 (2.855–4.748)	<0.0001	0.620	3.682 (1.717–7.900)	0.0005	10/10
Diabetes; obesity	0.635	3.726 (2.936–4.728)	<0.0001	0.635	3.726 (1.823–7.614)	0.0002	10/10
Diabetes; obesity; ADD1 ^a	0.638	3.725 (2.945–4.711)	<0.0001	0.638	3.725 (1.842–7.535)	0.0002	10/10
Diabetes; obesity; smoking; ADD1	0.639	3.952 (3.105–5.030)	<0.0001	0.628	3.467 (1.704–7.055)	0.0004	6/10

^aOverall best combination model with highest training balanced accuracy, highest testing accuracy, and best CV consistency. CV, cross validation.

Because obesity appeared to be an important risk factor for EH development in our MDR analysis, we have further done a crossover analysis (Table 6) and a stratified analysis (Table 7) to investigate whether the obesity or ADD1 rs4961 represented the greatest effect on the EH risk.

Results showed that both obesity and the TT genotype of ADD1 rs4961 greatly increased the susceptibility to hypertension, but obesity seems to have the major effect (OR = 5.936 vs. OR = 2.638) (Table 6).

In the stratified analysis, results showed that on obese individuals, the ADD1 rs4961 TT genotype had no significant association with EH ($p=0.546$). On the other hand, the TT genotype showed a significant increase in EH risk in non-obese individuals (OR = 2.648, 95% CI: 1.125–6.236; $p=0.021$), indicating that the risk for this polymorphism is greater when the person is nonobese (Table 7). The effect of obesity is much stronger than the existence of the ADD1 variant; however, an interaction between the two variables synergistically increases the risk of EH.

Discussion

It is well established that both genetic and environmental factors contribute to the regulation and maintenance of BP. With the beginning of the human genome project and the International HapMap Project, SNPs have become increasingly prominent in studies of both multifactorial and multi-genomic diseases (Kuneš and Zicha, 2009).

In the present work, there were three polymorphic variants, which were significantly associated to EH individually—rs4961, rs5443, and rs4343, this last on the threshold of

significance. ADD1 rs4961 was selected in the three-factor model along with obesity and diabetes as the best association model to predict EH. The four-factor model that included obesity, diabetes, ADD1 rs4961, and ACE rs4343 was also selected but had a slightly lower testing balanced accuracy and a weak cross-validation consistency.

The ADD1 G614T polymorphism (rs4961) results in the amino acid substitution of glycine by tryptophan (Gly460Trp), which is reported to be associated with a salt-sensitive form of hypertension. Cusi *et al.* (1997) found significant linkage of the alpha-adducin locus to EH ($p=0.0003$) and greater sensitivity to changes in sodium balance among patients with the mutant allele, suggesting that alpha-adducin is associated with a salt-sensitive form of EH (Cusi *et al.*, 1997). However, epidemiological studies have shown that the contribution of ADD1 Gly460Trp mutation to hypertension varies among different ethnic groups. A positive association of this genetic variant with EH has been confirmed in some studies (Tamaki *et al.*, 1998; Barlassina *et al.*, 2000; Ju *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2012), but not in others (Larson *et al.*, 2000; Niu *et al.*, 2010).

As far as we know, this study is the first attempt to establish the interaction between polymorphic variants associated with EH and several environmental risk factors, in the susceptibility to develop EH, in a cohort of Southern European origin. The interaction between ADD1 polymorphism and non-genetic risk factors, such as obesity and diabetes was identified as the overall optimum synergistic model by using a promising data-mining analytical method, MDR. This method has been successfully applied to detect high-order gene-gene and gene-environment interaction (Guy *et al.*, 2010).

TABLE 5. LOGISTIC REGRESSION ANALYSIS WITH MULTIFACTORIAL DIMENSIONALITY REDUCTION BEST MODEL AND CONFOUNDING VARIABLES

Variables	B	SE	Wald	df	Odds ratio (95% CI)	p Value
Smoking	-0.487	0.121	16.105	1	0.615 (0.485–0.780)	<0.0001
Sedentary life	0.206	0.101	4.190	1	1.229 (1.009–1.497)	0.041
Alcohol	0.329	0.104	9.957	1	1.390 (1.133–1.705)	0.002
ADD1 (GT + TT) × Diabetes (Yes) × Obesity (Yes)	2.307	0.744	9.611	1	10.044 (2.336–43.184)	0.002
Constant	-0.081	0.086	0.891	1	0.922	0.345

Forward Wald method (SPSS vs. 19.0) with all variables staying in the model.

Statistically significant for $p<0.05$.

B, beta coefficient; SE, standard error; df, degrees of freedom.

TABLE 6. CROSSOVER ANALYSIS BETWEEN OBESITY AND ADD1 GENOTYPES

Obesity	ADD1	Cases	Controls	OR (95% CI)	p Value
No	GG	373	492	— ^a	— ^a
	GT	133	178	0.986 (0.759–1.281)	0.913
	TT	16	8	2.638 (1.117–6.230)	0.022
Yes	GG	223	78	3.771 (2.819–5.044)	<0.0001
	GT	94	35	3.543 (2.349–5.342)	<0.0001
	TT	9	2	5.936 (1.275–27.635)	0.010

^aStatistically significant for $p < 0.05$.

^aOR and p -values obtained by the genotype frequency using the ADD1 GG genotype as reference among the nonobese individuals.

Such best interaction cannot be overlooked because in obesity there are a variety of endocrine, genetic, and metabolic mechanisms linked to each other that include insulin resistance, hyperinsulinemia, increased serum aldosterone levels, salt sensitivity, and expanded plasma volume with increased peripheral vascular resistance, which can lead to EH. Since BMI represents the internal metabolic and physiological environment that plays a key role in the development of high BP (Feng *et al.*, 2012), and ADD1 rs4961 is one of the most important targets for salt sensitivity and expanded plasma volume, it is not surprising that their interaction may play an important role in the susceptibility to hypertension. However, the exact pathophysiological mechanisms that contribute to this association require further study.

On the other hand, it is now established that insulin resistance, which predicts type 2 diabetes, also has a role in the development of hypertension (Sowers, 2004; Conen *et al.*, 2007). Indeed, hypertension and diabetes substantially share common pathways, such as obesity, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance.

In our case-control study, diabetes, obesity, alcohol consumption, and ADD1 TT genotype were confirmed as independent risk factors for EH by multivariate logistic regression. Curiously, smoking habits appear to be a protector factor. A likely explanation of these apparent protective effects of smoking on hypertension might be related to the fact that physicians had likely advised their hypertensive patients to quit smoking, so that the proportion of smoking hypertensives is lower than the proportion of non-smoking ones.

Further research on gene-gene and gene-environment interaction with well-designed studies containing large sample size and multiple genetic polymorphisms and environmental risk factors are needed to provide more precise evidence for the issue.

TABLE 7. STRATIFIED ANALYSIS WITH THE INTERACTION BETWEEN OBESITY AND ADD1 GENOTYPES

Obesity	ADD1	Cases	Controls	OR (95% CI)	p Value
No	GG	373	492	—	—
	GT	133	178	2.648 (1.125–6.236)	0.021
	TT	16	8	—	—
Yes	GG	223	78	—	—
	GT	94	35	1.604 (0.341–7.536)	0.546
	TT	9	2	—	—

OR and p -values obtained by the recessive model (TT vs. GG+GT).
Statistically significant for $p < 0.05$.

Strength and limitations

One limitation of the study was that only 13 polymorphisms of relevant genes for EH were analyzed, and it is of added interest to explore other candidate genes within different metabolic axes and other emerged from GWAS with yet unknown pathophysiological mechanisms.

Other limitation to the approach is that MDR method does not have a way to adjust for covariate effects, such as age, gender, alcohol, and smoking status, an often necessary step to obtain an unconfounded SNP interactions outcome. For this reason, we used a second logistic regression with the MDR best model adjusted for confounded variables and so we were able to confirm the independence of this interaction.

A strength of our study was the specificity of our population, which is supposed to be a genetically homogeneous Southern European Caucasian population (Brehm *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2005). The use of genetically isolated populations has been particularly valuable for mapping rare recessive disorders, or more complex disorders due to a relatively uniform genetic background of the populations (Kristiansson *et al.*, 2008). Some culturally and genetically isolated populations have a more similar way of living, eating habits, and natural environment that reduces environmental variation (Jorde and Wooding, 2004).

Conclusion

According to our findings, the evolution to EH may actually be affected by the interaction of ADD1 rs4961, obesity, and type 2 diabetes in our population. In patients carrying this polymorphism, involved in salt handling, it will be of utmost importance the modification of lifestyle.

Acknowledgment

The authors are very grateful to Elsa Sousa who performed the phone calls to the subjects and all the administrative procedures.

Grants

This study was supported by the European Regional Development Fund's Operational Program for the Enhancement of Economic Potential and Territorial Cohesion for the Autonomous Region of Madeira (INTERVIR+).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Altshuler D, Daly MJ, Lander ES (2008) Genetic mapping in human disease. *Science* 322:881–888.
- Barlassina C, Norton GR, Samani NJ, *et al.* (2000) Alpha-adducin polymorphism in hypertensives of South African ancestry. *Am J Hypertens* 13:719–723.
- Brehm A, Pereira L, Kivisild T, *et al.* (2003) Mitochondrial portraits of the Madeira and Açores archipelagos witness different genetic pools of its settlers. *Hum Genet* 114:77–86.
- Carretero OA, Oparil S (2000) Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 101:329–335.

GENES, ENVIRONMENTAL RISK FACTORS AND ESSENTIAL HYPERTENSION

7

- Conen D, Ridker PM, Mora S, *et al.* (2007) Blood pressure and risk of developing type 2 diabetes mellitus: the Women's Health Study. *Eur Heart J* 28:2937–2943.
- Cowley AW, Jr. (2006) The genetic dissection of essential hypertension. *Nat Rev Genet* 7:829–840.
- Cusi D, Barlassina C, Azzani T, *et al.* (1997) Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* 349:1353–1357.
- Elret GB, Morrison AC, O'Connor AA, *et al.* (2008) Replication of the Wellcome Trust genome-wide association study of essential hypertension: the Family Blood Pressure Program. *Eur J Hum Genet* 16:1507–1511.
- Elret GB, Munroe PB, Rice KM, *et al.* (2011) Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 478:103–109.
- European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee (2003) 2003 European society of Hypertension-European society of cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 21:1011–1053.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003) Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 Suppl 1:S5–S20.
- Feng RN, Zhao C, Wang C, *et al.* (2012) BMI is strongly associated with hypertension, and waist circumference is strongly associated with type 2 diabetes and dyslipidemia, in northern Chinese adults. *J Epidemiol* 22:317–323.
- Goncalves R, Freitas A, Branco M, *et al.* (2005) Y-chromosome lineages from Portugal, Madeira and Azores record elements of Sephardim and Berber Ancestry. *Ann Human Genet* 69:443–454.
- Guy J, Andrew AS, Andrews P, *et al.* (2010) A simple and computationally efficient sampling approach to covariate adjustment for multifactor dimensionality reduction analysis of epistasis. *Hum Hered* 70:219–225.
- Ji L, Cai X, Zhang L, *et al.* (2013) Association between polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system genes and essential hypertension in the Han Chinese population. *PLoS One* 8:e72701.
- Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, *et al.* (2008) Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet* 40:592–599.
- Jorde L, Wooding SP (2004) Genetic variation, classification and race. *Nat Genet* 36 Suppl 11:S28–S33.
- Joseph PG, Pare G, Anand SS (2013) Exploring gene-environment relationships in cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 29:37–45.
- Ju Z, Zhang H, Sun K, *et al.* (2008) Alpha-adducin gene polymorphism is associated with essential hypertension in Chinese: a case-control and family-based study. *J Hypertens* 21:1861–1868.
- Kristiansson K, Naukkarinen J, Peltonen L (2008) Isolated populations and complex disease gene identification. *Genome Biol* 9:109.
- Kuneš J, Zicha J (2009) The interaction of genetic and environmental factors in the etiology of hypertension. *Physiol Res* 58 Suppl 2:S33–S41.
- Larson N, Hutchinson R, Boerwinkle E (2000) Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension* 35:1297–1300.
- Levy D, Elret GB, Rice K, *et al.* (2009) Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet* 41:677–687.
- Levy D, Larson MG, Benjamin EJ, *et al.* (2007) Framingham Heart Study 100K project: genome-wide associations for blood pressure and arterial stiffness. *BMC Med Genet* 8 Suppl 1:S3.
- Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104:545–556.
- Li K, Liang Y, Sun Y, *et al.* (2012) The relationship between polymorphisms at 17 gene sites and hypertension among the aboriginal Tibetan people. *Biomed Environ Sci* 25: 526–532.
- Mein CA, Caulfield MJ, Dobson RJ, *et al.* (2004) Genetics of essential hypertension. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R169–R175.
- National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute North American Association for the Study of Obesity (2000) The practical guide: identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. NHLBI Obesity Education Initiative, NIH Publication Number: 00-4084.
- Niu WQ, Zhang Y, Ji KD, *et al.* (2010) Lack of association between alpha-adducin G460W polymorphism and hypertension: evidence from a case-control study and a meta-analysis. *J Hum Hypertens* 24:467–474.
- Okamoto K, Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27:282–293.
- Oparil S, Zaman A, Calhoun DA (2003) Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med* 139:761–776.
- Sowers JR (2004) Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1597–H1602.
- Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, *et al.* (1998) Polymorphism of alpha-adducin in Japanese patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 21:29–32.
- The Department of Health, Government of Australia (2014) Physical Activity and Sedentary Behavior Guidelines. Available at www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/content/health-pubhlth-strateg-phys-act-guidelines
- Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447:661–678.
- Yang CH, Lin YD, Yang CS, *et al.* (2015) An efficiency analysis of high-order combinations of gene-gene interactions using multifactor-dimensionality reduction. *BMC Genomics* 16:489.
- Zuoguang W, Xiaoyun P, Yongxiang W, *et al.* (2013) Neglect of several important indexes during the study of human arterial hypertension. *J Clin Hypertens* 15:11.

Address correspondence to:

Ana Célia Sousa 
 Unidade de Investigação
 Hospital Doutor Nélito Mendonça
 Avenida Luís de Camões, no. 57
 Funchal, Madeira 9004-514
 Portugal

E-mail: anacelia.bett@gmail.com

AUTHOR QUERY FOR GTMB-2017-0048-VER9-SOUSA 1P

- AU1: Please note that gene symbols in any article should be formatted per the gene nomenclature. Thus, please make sure that gene symbols, if present in this article, are italicized.
- AU2: Please review all authors' surnames for accurate indexing citations.
- AU3: Please provide department name in all the affiliations.
- AU4: Please rephrase either Abstract or Introduction. As per journal style, the content in the Abstract and Introduction cannot be identical text. Thank you.
- AU5: The Publisher requests for readability that no paragraph exceeds 15 typeset lines. Please check for long paragraphs and divide where needed.
- AU6: Please provide last accessed date for reference The Department of Health, Government of Australia (2014).
- AU7: Please provide degrees of the corresponding author.
- AU8: Please mention the significance of bold values in Table 4 footnote.

ANEXO 3

ACTA MÉDICA PORTUGUESA

**USER**

You are logged in as...
accousa000

- [My Profile](#)
- [Log Out](#)

AUTHOR

Submissions

- [Active \(1\)](#)
- [Archive \(0\)](#)
- [New Submission](#)

NOTIFICATIONS

- [View](#)
- [Manage](#)

LANGUAGE

Select Language

English ▼

JOURNAL CONTENT

Search

Search Scope

All ▼

Browse

- [By Issue](#)
- [By Author](#)
- [By Title](#)

INFORMATION

- [For Readers](#)
- [For Authors](#)
- [For Librarians](#)

[Journal Help](#)

KEYWORDS

[Adolescent](#) [Child](#) [Clinical Competence](#) [Diabetes](#)
[Medical](#) [Time 2 Education](#) [Medical Education](#)
[Medical](#) [Undergraduate Educational Measurement](#)
[HIV Infections](#) [Infant](#) [Neonatal](#) [Magnetic Resonance](#)
[Imaging](#) [National Health Programs](#) [Portugal](#)
[Painful](#) [Pregnancy](#) [Prognosis](#) [Public Health](#)
[Quality of Life Questionnaires](#) [Randomized](#)
[Controlled Trials as Topic](#) [Stomach Neoplasms](#)
[Surveys and Questionnaires](#)

[HOME](#) [ABOUT](#) [USER HOME](#) [SEARCH](#)[CURRENT](#) [ARCHIVES](#) [WEBSITE](#)[Home](#) > [User](#) > [Author](#) > [Active Submissions](#)

Active Submissions

[ACTIVE](#) [ARCHIVE](#)

ID	MM-DD SUBMIT	REC	AUTHORS	TITLE	STATUS
9184	05-15	ORI	Sousa, Palma dos Reis, Pereira,...	POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO APARECIMENTO DE	IN REVIEW ROUND 2

1 - 1 of 1 items

Start a New Submission

[CLICK HERE](#) to go to step one of the five-step submission process.

Refbacks

[ALL](#) [NEW](#) [PUBLISHED](#) [IGNORED](#)

DATE ADDED	HITS	URL	ARTICLE	TITLE	STATUS	ACTION
--------------------------------	----------------------	---------------------	-------------------------	-----------------------	------------------------	------------------------

There are currently no refbacks.

ISSN: 1646-0758

POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO APARECIMENTO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL NUMA POPULAÇÃO PORTUGUESA

GENETIC POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH THE APPEARANCE OF ARTERIAL HYPERTENSION IN A PORTUGUESE POPULATION

Ana Célia Sousa¹, Roberto Palma dos Reis², Andreia Pereira¹, Sofia Borges¹, Ana Isabel Freitas¹, Graça Guerra¹, Sara Gouveia¹, Teresa Góis¹, Lino Nóbrega¹, Mariana Rodrigues¹, Eva Henriques¹, Sónia Freitas¹, Ilídio Ornelas¹, Décio Pereira¹, António Brehm³, Maria Isabel Mendonça¹

*autor correspondente

Email: anacelia.bett@gmail.com

Phone: +351-291-709600

Fax: +351-291-709677

¹Unidade de Investigação, Hospital Doutor Nélio Mendonça
Avenida Luís de Camões, nº 57
9004-514 Funchal – Madeira
Portugal

²Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa
Campo dos Mártires da Pátria, n.º 130
1169-056 Lisboa
Portugal

³Laboratório de Genética Humana, Universidade da Madeira
Campus da Penteada
9020-105 Funchal
Portugal

Título breve: Polimorfismos e Hipertensão Arterial

POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO APARECIMENTO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL NUMA POPULAÇÃO PORTUGUESA

Introdução: A Hipertensão Arterial é uma doença complexa, multifatorial, controlada por fatores genéticos e ambientais.

Objetivo: Avaliar se um conjunto de variantes genéticas específicas são fatores de suscetibilidade para a hipertensão numa população portuguesa e avaliar a sua interação com os factores de risco tradicionais.

Métodos: Estudo caso-controlo com 1712 indivíduos, idade média de $51,0 \pm 7,9$ anos (860 hipertensos e 852 controlos). Avaliaram-se os fatores tradicionais, bioquímicos e as variantes genéticas: *ACE* I/D rs4340, *ACE* A2350G rs4343, *AGT* T174M rs4762, *AGT* M235T rs699, *AGTR1* A1166C rs5186, *CYP11B2* C-344T rs1799998, *ADRB2* R16G rs1042713, *ADD1* G460W rs4961, *SCNN1G* G-173A rs5718, *GNB3* C825T rs5443, *ATP2B1* A/G rs2681472, *CYP17A1* T/C rs11191548 e *SLC4A2* C/T rs2303934. Calculámos o risco de cada gene para a hipertensão, pelos modelos dominante, recessivo, co-dominante e multiplicativo. Através da regressão logística, avaliámos as variáveis associadas à hipertensão. Elaboraram-se curvas *ROC* com os fatores tradicionais e posteriormente adicionando as variantes genéticas associadas com hipertensão. Analisámos os dados através do *SPSS for Windows 19.0* e *MedCalc vs. 13.3.3.0*.

Resultados: As variantes genéticas *ADD1* rs4961, *GNB3* rs5443, *ACE* rs4340 e *ACE* rs4343 associaram-se à hipertensão. A curva *ROC* com os factores tradicionais e estas variantes mostrou um incremento na capacidade preditiva de hipertensão ($p=0,018$).

Conclusões: No nosso estudo os polimorfismos associados à hipertensão, estão ligados ao eixo renina-angiotensina-aldosterona (*ACE* rs4340 e rs4343), bem como à gestão de sal e água (*ADD1* rs4961, *GNB3* rs5443). A análise multivariada detectou interação significativa entre as variantes *ADD1*, *GNB3* e os fatores tradicionais na capacidade preditiva de hipertensão.

Palavras-chave: Polimorfismos genéticos; Hipertensão Arterial; Factores de risco tradicionais; estudo caso – controlo

Abstract

Introduction: Arterial Hypertension is a complex, multifactorial disease, controlled by genetic and environmental factors.

Objective: Evaluate whether a set of specific genetic variants are susceptibility factors for hypertension in a Portuguese population and evaluate its interaction with traditional risk factors.

Methods: Case-control study with 1712 individuals, mean age of 51.0 ± 7.9 years (860 hypertensive patients and 852 controls). Biochemical and traditional risk factors, and genetic variants were evaluated: *ACE* I/D rs4340, *ACE* A2350G rs4343, *AGT* T174M rs4762, *AGT* M235T rs699, *AGTR1* A1166C rs5186, *CYP11B2* C-344T rs1799998, *ADRB2* R16G rs1042713, *ADD1* G460W rs4961, *SCNN1G* G-173A rs5718, *GNB3* C825T rs5443, *ATP2B1* A/G rs2681472, *CYP17A1* T/C rs11191548 and *SLC4A2* C/T rs2303934. The risk of each gene for hypertension was estimated by the dominant, recessive, co-dominant and multiplicative models. By logistic regression, variables associated with hypertension were evaluated. ROC curves were first performed with traditional risk factors and then adding the genetic variants associated with hypertension. Data were analyzed by SPSS for Windows 19.0 and MedCalc V. 13.3.3.0.

Results: The genetic variants *ADD1* rs4961, *GNB3* rs5443, *ACE* rs4340, *ACE* rs4343 were associated with hypertension. ROC curve with traditional risk factors and these variants showed an increase in the predictive capacity of hypertension ($p = 0.018$).

Conclusions: In our study, the hypertension-associated polymorphisms are linked to the renin-angiotensin-aldosterone axis (*ACE* rs4340 and rs4343), as well as to salt and water management (*ADD1* rs4961, *GNB3* rs5443). Multivariate analysis showed significant interaction between the *ADD1*, *GNB3* and traditional risk factors in the predictive capacity of hypertension.

Introdução

A Hipertensão Arterial (HTA) é um importante problema de saúde pública que afeta mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, sendo um fator de risco para enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença renal crônica.¹ Na população adulta portuguesa, a sua prevalência global é de 42%, sendo de 44,4% nos homens e de 40,2% nas mulheres.²

O principal obstáculo para a compreensão dos mecanismos patogénicos da HTA humana, decorre da complexidade e heterogeneidade da doença. De fato, embora no nível clínico o quadro pareça bastante uniforme, uma variedade de fatores poligénicos e ambientais poderão estar envolvidos na sua génese.³ A maioria dos fatores ambientais que influenciam a pressão arterial foi já identificada^{4,5}, mas os fatores genéticos são pouco conhecidos. Vários estudos confirmam a natureza multigénica da pressão arterial em geral^{6,7} e da HTA essencial em particular⁸. Estima-se que os fatores genéticos sejam responsáveis por cerca de 30% da variação tensional em várias populações.⁹

Com o aparecimento dos estudos de associação genómica em larga escala (GWAS), muitos se têm dedicado à HTA essencial. Em 2009, dois estudos de GWAS, cada um com mais de 25.000 indivíduos de ascendência europeia, identificaram 13 *loci* associados à Pressão Arterial Sistólica (PAS), Diastólica (PAD) e HTA.^{10,11} Um outro estudo feito numa população afro-americana, evidenciou associações entre vários genes e a PAS.¹² Mais recentemente, em 2011 são relatados pelo Consórcio Internacional de Pressão Arterial (ICBP), 29 variantes genéticas independentes, identificadas pelo GWAS que influenciam a PA em pessoas de ascendência europeia.¹³

A identificação de genes candidatos que medeiam a suscetibilidade para a HTA, continua a ser objeto de estudo, principalmente utilizando estudos de associação em seres humanos, mas também utilizando estudos fisiológicos e farmacológicos de intervenção em modelos animais e em estirpes geneticamente modificadas. Sendo assim novas abordagens genéticas, avançam no sentido da compreensão e estudo dos genes que codificam os componentes das vias biológicas, fisiológicas e funções celulares da HTA.¹⁰

Foram incluídos no presente estudo, polimorfismos genéticos de *loci* biologicamente plausíveis para HTA, nomeadamente: a *enzima conversora de*

angiotensina (ACE) I/D ref snp (rs) 4340; ACE A2350G rs4343; o angiotensinogénio (AGT) T174M rs4762; AGT M235T rs699 ; o receptor da angiotensina II tipo 1 (AGTR1) A1166C rs5186 ; o citocromo P450 membro 2 da família 11, subfamília B (CYP11B2) C-344T rs1799998; o citocromo P450 membro 1 da família 17, subfamília A (CYP17A1) T/C rs11191548; o receptor adrenérgico beta 2 (ADRB2) R16G rs1042713; a alfa-aducina 1 (ADD1) G460W rs4961; o canal de sódio epitelial 1, subunidade gama (SCNN1G) G-173A rs5718 ; a proteína G, subunidade beta 3 (GNB3) C825T rs5443 ; ATPase de Transporte de Cálcio da Membrana Plasmática (ATP2B1) A/G rs2681472 e a família portadora do soluto 4, membro 2 (SLC4A2) C/T rs2303934.

O objetivo do presente estudo foi avaliar se estes polimorfismos genéticos são factores de susceptibilidade para o aparecimento de HTA Essencial numa população portuguesa. Procurou-se investigar também se há interacção significativa entre as variantes genéticas e os fatores de risco tradicionais (FRT) na capacidade de predizer o risco de HTA.

Material e Métodos

População do Estudo

O estudo foi realizado no Arquipélago da Madeira (Portugal), cuja população é de cerca de 300.000 habitantes. Todos os participantes incluídos no estudo são de raça Caucasiana, naturais do Arquipélago da Madeira, sendo os seus progenitores na 1ª e 2ª gerações igualmente Caucasianos e nascidos neste arquipélago.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Central do Funchal e conduzido de acordo com a Declaração de Helsínquia. O consentimento informado de cada participante foi obtido por escrito, com permissão explícita para as análises bioquímicas e de ADN bem como para a colheita de dados clínicos relevantes.

Fizemos um estudo caso-controlo com 1712 indivíduos com média de idade de $51,0 \pm 7,9$ anos, sendo 51% do género masculino. Constituímos dois grupos, um

com 860 indivíduos hipertensos (idade média $51,4 \pm 8$; 53,3% do gênero masculino) e outro com 852 controles (idade média $50,7 \pm 7,7$; 48,7% do gênero masculino). Os casos foram seleccionados consecutivamente durante um período de 3 anos à medida que recorriam à consulta com o seu médico assistente. Os controles também foram seleccionados por uma amostragem aleatória dos ficheiros clínicos da consulta de Medicina Geral e Familiar. Os controles foram ajustados com os casos em termos de sexo e idade.

Dos 860 hipertensos, 38 (4,4%) não faziam qualquer tipo de terapêutica hipertensiva.

Definição de Hipertensão Arterial

A HTA foi considerada quando os pacientes, à entrada do estudo, já estavam diagnosticados e/ou tinham medicação anti-hipertensiva há pelo menos 3 meses ou quando diagnosticados com PAS/PAD $\geq 140/90$ mmHg medido em pelo menos 3 ocasiões.¹⁴

Os controles normotensos nunca tinham sido tratados com medicação anti-hipertensiva e apresentaram PAS/PAD $< 140/90$ mmHg.

A pressão arterial foi medida, após 10 minutos de repouso, no braço direito, posição de sentado, usando um esfigmomanómetro *Welch Allyn* padrão (fases I a V). Registou-se a média de três leituras obtidas com 2 min de intervalo.¹⁴

Excluíram-se do estudo os indivíduos com hipertensão secundária, insuficiência de órgãos múltiplos, distúrbios mentais, doença inflamatória crónica, grávidas ou doentes medicados para outras patologias com fármacos que pudessem afetar a pressão arterial.

Recolha de dados

Na primeira consulta, todos os participantes responderam a um questionário padronizado feito pelo médico assistente com referência à idade, sexo, estilo de vida, tabagismo, consumo de álcool e terapêutica medicamentosa. A altura foi medida em centímetros e obtido o peso em quilogramas. Calculámos o índice de massa corporal (IMC), utilizando a fórmula ($IMC = \text{Peso, kg} / \text{Altura, m}^2$). A obesidade foi definida como $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$.¹⁵

O diagnóstico de diabetes mellitus foi verificado quando os pacientes tinham uma história de diabetes confirmada e/ou cumpriam terapêutica para esta condição clínica ou quando o seu nível de glicose em jejum excedia os 126 mg/dL ou quando a hemoglobina glicosilada A1C era superior a 6,5%. ¹⁶

Considerou-se o sedentarismo quando os indivíduos não praticavam pelo menos 150 minutos por semana de atividade física moderadamente vigorosa. ¹⁷

Considerou-se o tabagismo e os hábitos etílicos quando os indivíduos tinham estes hábitos à data de entrada do estudo. O tabagismo foi categorizado consoante o número de cigarros consumidos por dia (<10; 10-20; >20). Os hábitos etílicos foram quantificados consoante as gramas/dia ingeridas.

Análise bioquímica

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório Central do Hospital, de acordo com as técnicas usuais.

As amostras de sangue foram extraídas após 14-16 horas de jejum e o plasma foi preparado para a quantificação dos perfis biológicos. As concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total, triglicéridos, colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) e colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) foram medidas utilizando métodos padronizados no Laboratório Central do Hospital.

Análise genética

Extraímos o ADN genómico das células leucocitárias do sangue periférico usando o método *padrão de relargagem*. A genotipagem foi realizada em placas óticas de 96 poços, com recurso à técnica *TaqMan* (Applied Biosystems/Life Technologies/ThermoFisher Scientific), conforme as especificações do fornecedor: *ACE* I/D rs4340 (polimorfismo *A/u* substituído no ensaio *TaqMan* pelo SNP rs4341, C__29403047_10, com o qual se encontra em estrito desequilíbrio de ligação alélica), *ACE* A2350G rs4343 (C__11942562_20), *AGT* T174M rs4762 (C__1985480_20), *AGT* M235T rs699 (C__1985481_20), *AGTR1* A1166C rs5186 (C__3187716_10), *CYP11B2* C-344T rs1799998 (C__8896484_10), *ADRB2* R16G rs1042713 (C__2084764_20), *ADD1* G460W rs4961 (C__11764545_20), *SCNN1G* G-

173A rs5718 (C___894888_10), *GNB3* C825T rs5443 (C___2184734_10), *ATP2B1* A/G rs2681472 (C___16057071_10), *CYP17A1* T/C rs11191548 (C___31979323_10) e *SLC4A2* C/T rs2303934 (C___15972981_20). Os oligonucleótidos foram sintetizados e os marcadores fluorogénicos FAM e VIC acoplados às extremidades 5' das sondas de modo a alcançar a discriminação alélica. A reacção de polimerização em 2 passos consistiu em 40 ciclos de desnaturação a 92°C durante 15 segundos e de hibridização/extensão a 60°C durante 1 minuto. Após a amplificação no aparelho *ABI Prism 7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems/Life Technologies/ThermoFisher Scientific), os resultados foram analisados com recurso ao *7300 System Sequence Detection Software (SDS)* (Applied Biosystems/ Life Technologies/ThermoFisher Scientific), com a respectiva atribuição de genótipos, sem qualquer conhecimento prévio dos dados clínicos individuais. O controlo de qualidade às técnicas de genotipagem fez-se com a inclusão de um *non-template control (NTC)* em cada placa de 96 poços. Somente foram consideradas para posterior análise as amplificações cujo *NTC* não ultrapassou a linha *cut-off* de amplificação. Efetuaram-se duplicados cegos para todos os ensaios *TaqMan* utilizando cerca de 20% do total de amostras. A genotipagem foi ainda confirmada por sequenciação direta de 10% das amostras para todos os *SNPs*. Os resultados foram replicativos e tiveram uma correspondência na ordem dos 95-99% em relação à técnica *TaqMan* e/ou ao primeiro ensaio *TaqMan*.

Análise estatística

As variáveis contínuas foram expressas pela média $\pm$ desvio padrão nas variáveis de distribuição normalizada, ou, se tal não aconteceu pela mediana (mínimo - máximo). Para comparar estas variáveis entre casos e controlos foi utilizado o teste *t de Student* para amostras independentes ou *Mann-Whitney* (conforme apropriado). As variáveis categóricas foram apresentadas através da frequência e percentagem e comparadas pelo teste Qui-quadrado.

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para os genótipos dentro de cada *locus* foi calculado através do teste Qui-quadrado e considerou-se em equilíbrio os genes

que apresentavam valor p menor que $0,05/14=0,004$, após a correcção de Bonferroni.

Na análise multivariada, para verificar quais as variáveis associadas independentemente com a HTA, fizemos uma regressão logística em que entraram os os FRT: obesidade, diabetes, hábitos tabágicos e alcoólicos, sedentarismo assim como as variantes genéticas que, na análise univariada, se associaram de forma significativa com a HTA: *ADD1* rs4961, *GNB3* rs5443, *ACE* rs4340 e *ACE* rs4343. Para a seleção da ordem de entrada das variáveis no modelo foi usado o método *Forward Wald*.

Para avaliar a capacidade preditiva para a HTA, elaborámos curvas *ROC* (*receiver operating characteristic*) e cálculo das respectivas *AUC* (*Area Under the Curve*) inicialmente só com os FRT, e posteriormente adicionando as variantes *ADD1* rs4961, *GNB3* rs5443, *ACE* rs4340 e *ACE* rs4343 aos FRT. As duas curvas foram comparadas pelo teste *Delong*. Fizemos a calibração dos modelos pelo teste de *Hosmer Lemeshow*.

Analísamos os dados estatísticos recorrendo ao *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Software version 19.0)* (IBM, Armonk, NY, USA) e ao software *MedCalc vs. 13.3.3.0*.

O limiar de significância foi de $p<0,05$. Todas as análises foram bilaterais.

Resultados

Características gerais da população estudada

A população estudada foi composta por 860 casos com HTA, com idade média de $51,4 \pm 8$ (53,3% sexo masculino), e 852 controlos sem HTA), com idade média de $50,7 \pm 7,7$ (48,7% sexo masculino).

As características basais da nossa amostra são apresentadas na Tabela 1. O sexo e a idade foram semelhantes nos dois grupos pelo ajustamento das populações de acordo com a metodologia do estudo. Comparando o grupo dos casos com o dos controlos (Tabela 1), houve uma diferença significativa em relação às seguintes variáveis que apresentaram valores médios mais elevados no grupo dos hipertensos em relação aos controlos: sedentarismo ($p=0,018$), hábitos etílicos ($p=0,019$), diabetes ($p<0,0001$), obesidade ($p<0,0001$), IMC

($p < 0,0001$), PAS ($p < 0,0001$), PAD ($p < 0,0001$) e frequência cardíaca ($p = 0,001$). Em relação ao tabagismo, verificámos uma maior percentagem no grupo dos controlos em relação aos hipertensos e com significância estatística ($p = 0,001$), com exceção dos indivíduos que fumavam mais de 20 cigarros por dia. A percentagem de ex-fumadores mostrou ser superior nos indivíduos com hipertensão ($p < 0,0001$).

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos participantes do estudo

Variáveis	Total (n=1712)	Hipertensos (n=860)	Controlos (n=852)	Valor p
Idade (anos)	51 ± 7,9	51,4 ± 8	50,7 ± 7,7	0,069
Sexo masculino, n (%)	873 (51)	458 (53,3)	415 (48,7)	0,060
Sedentarismo, n (%)	915 (53,4)	484 (56,3)	431 (50,6)	0,018
Hábitos etílicos, n (%)	634 (37)	342 (39,8)	292 (34,3)	0,019
Hábitos etílicos, gr/dia	0 (17 – 425)	0 (17,3 – 425)	0 (14,3 – 212,5)	<0,0001
Tabagismo, n (%)	392 (22,9)	169 (19,7)	223 (26,2)	0,001
1 a 10 cig/dia, n (%)	144 (37,4)	59 (35,1)	85 (39,2)	0,004
10 a 20 cig/dia, n (%)	120 (31,2)	42 (25)	78 (35,9)	
>20 cig/dia, n (%)	121 (31,4)	67 (39,9)	54 (24,9)	
Ex-fumadores, n (%)	178 (10,4)	126 (14,7)	52 (6,1)	<0,0001
Diabetes, n (%)	203 (11,9)	163 (19)	40 (4,7)	<0,0001
Diabéticos medicados, n (%)	188 (92,6)	160 (98,2)	25 (62,5)	<0,0001
Obesidade, n (%)	457 (26,7)	330 (38,4)	127 (14,9)	<0,0001
IMC (kg/m ²)	27,7 ± 4,8	29,1 ± 5,2	26,2 ± 4	<0,0001
PAS (mmHg)	134,1 ± 20,5	147,5 ± 19	120,7 ± 11	<0,0001
PAD (mmHg)	84,2 ± 12,2	91 ± 11,9	77,2 ± 7,9	<0,0001
FC (bat./min.)	72 ± 11,7	72,9 ± 12,2	71 ± 11,1	0,001

IMC – Índice de massa corporal; PAS – Pressão arterial sistólica; PAD – Pressão arterial diastólica; FC - Frequência cardíaca; bat./min. - batimentos/minuto; Valores contínuos expressos pela média ± desvio padrão exceto os “hábitos etílicos” que estão representados pela mediana (Percentil 75 - máximo); Valores significativos para $p < 0,05$.

Em relação às variáveis bioquímicas (Tabela 2), houve uma diferença significativa entre ambos os grupos relativamente à hemoglobina, leucócitos, triglicerídeos, glicose em jejum e proteína C reativa de alta sensibilidade (*PCR-as*) que apresentaram valores médios mais elevados no grupo dos hipertensos em relação aos controlos ($p<0,0001$). Os níveis de HDL foram mais baixos nos hipertensos do que nos controlos ($p<0,0001$). Em relação ao colesterol total, LDL e plaquetas não houve diferença significativa entre os dois grupos ($p>0,05$).

Tabela 2: Características bioquímicas dos participantes do estudo

Variáveis	Total (n=1712)	Hipertensos (n=860)	Controlos (n=852)	Valor p
Hemoglobina (g/dl)	14,2 (9,6-18,2)	14,4 (9,6-18,2)	14,2 (10,1-17,6)	$<0,0001$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$)	229 (23-664)	233 (23-664)	228 (65-544)	0,099
Leucócitos ($10^3/\mu\text{l}$)	6,4 (2,1-16,6)	6,7 (2,9-14,8)	6,3 (2,1-16,6)	$<0,0001$
Colesterol (mg/dl)	206 (100-370)	206,5 (100-346)	206 (107-370)	0,776
HDL-C (mg/dl)	48 (17,2-111,7)	47 (17,2-104)	49,0 (20,8-111,7)	$<0,0001$
LDL-C (mg/dl)	129 (37,7-269)	128,4 (37,7-269)	130 (42-260)	0,082
Triglicéridos (mg/dl)	111 (21-1098)	122,5 (29-1098)	100 (21-688)	$<0,0001$
PCR-as (mg/dl)	0,22 (0,01-19,62)	0,23 (0,02-19,62)	0,2 (0,01-18,51)	$<0,0001$
Glicose (mg/dl)	96 (66-364)	99 (70-360)	94 (66-364)	$<0,0001$

HDL-C – colesterol das lipoproteínas de alta densidade; LDL-C – colesterol das lipoproteínas de baixa densidade; PCR-as – Proteína C reactiva-alta sensibilidade; Valores apresentados pela mediana (mínimo - máximo); Valores significativos para $p<0,05$.

Variantes genéticas que se associaram com o aparecimento de HTA

Avaliámos as 13 variantes genéticas, mas apenas 4 mostraram associação com o aparecimento de HTA (Tabela 3). Nomeadamente, os polimorfismos da: alfa-aducina *ADD1* rs4961 nos modelos recessivo ($p=0,003$) e co-dominante ($p=0,004$); os da subunidade $\beta 3$ da Proteína G (*GNB3* rs5443) nos modelos dominante ($p=0,004$) e multiplicativo ($p=0,044$); os da enzima de conversão da angiotensina (*ACE* rs4340) nos modelos recessivo ($p=0,032$) e multiplicativo ($p=0,025$) e co-dominante ($p=0,059$) e os da *ACE* rs4343 nos modelos recessivo ($p=0,036$), multiplicativo ($p=0,023$) e co-dominante ($p=0,028$).

Tabela 3: Variantes genéticas que se associaram com o aparecimento de hipertensão arterial

Genes		Casos (n=860)	Controlos (n=852)	Modelos			
				Dominante	Recessivo	Multiplicativo	Co-dominante
ACE rs4340	II	110 (12,8)	128 (15)	1,205	1,233	1,173	1,327
	ID	368 (42,8)	389 (45,7)	(0,916-1,586)	(1,018-1,495)	(1,020-1,348)	(0,989-1,780)
	DD	382 (44,4)	335 (39,3)	p=0,182	p=0,032	p=0,025	p=0,059
ACE rs4343	AA	143 (16,6)	167 (19,6)	1,222	1,244	1,170	1,369
	AG	424 (49,3)	435 (51,1)	(0,955-1,564)	(1,015-1,526)	(1,022-1,340)	(1,035-1,811)
	GG	293 (34,1)	250 (29,3)	p=0,110	p=0,036	p=0,023	p=0,028
ADD1 rs4961	GG	600 (69,8)	617 (72,4)	1,138	2,763	1,202	2,805
	GT	230 (26,7)	224 (26,3)	(0,923-1,402)	(1,376-5,551)	(0,999-1,446)	(1,393-5,647)
	TT	30 (3,5)	11 (1,3)	p=0,226	p=0,003	p=0,051	p=0,004
GNB3 rs5443	CC	286 (33,3)	341 (40)	1,339	0,998	1,152	1,201
	CT	440 (51,2)	378 (44,4)	(1,100-1,631)	(0,769-1,296)	(1,004-1,321)	(0,902-1,600)
	TT	134 (15,6)	133 (15,6)	p=0,004	p=0,987	p=0,044	p=0,210

ACE – Enzima Conversora de Angiotensina; ADD1 – alfa-aducina 1; GNB3 - subunidade β3 da proteína G.

Posteriormente, fizemos uma análise de regressão logística (Tabela 4) com as 4 variáveis genéticas que, na análise univariada, se associaram à HTA e com os FRT como a obesidade, diabetes, hábitos tabágicos e etílicos e sedentarismo. As variáveis que permaneceram na equação e que se associam de forma significativa e independente com o aparecimento de HTA foram: obesidade ($p<0,0001$), diabetes ($p<0,0001$), hábitos etílicos ($p=0,013$) e o genótipo WW do gene *ADD1* ($p=0,013$) e o CT do *GNB3* ($p=0,010$).

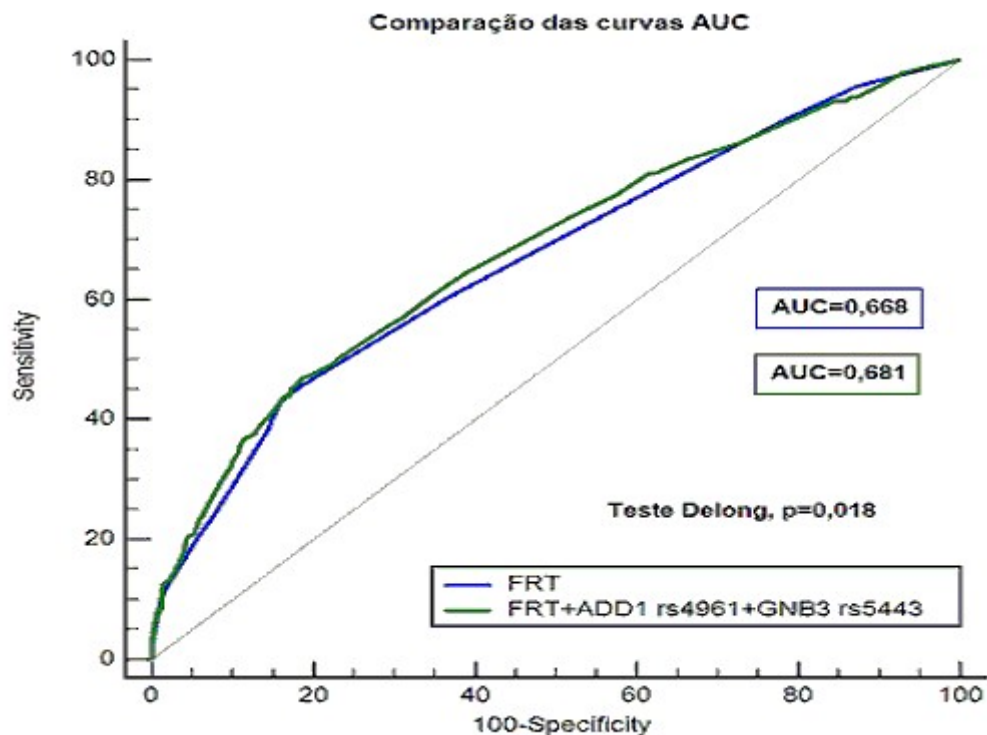
Os hábitos tabágicos surgem na equação como variável protetora em relação ao aparecimento de HTA ($p=0,001$).

Tabela 4: Análise de regressão logística* para predição da doença hipertensiva

Variáveis	B	S.E.	Wald	df	Odds ratio (IC 95%)	Valor p
Tabagismo	-0,413	0,125	10,959	1	0,662 (0,518 – 0,845)	0,001
Hábitos etílicos	0,267	0,108	6,171	1	1,306 (1,058 – 1,613)	0,013
Obesidade	1,144	0,122	87,372	1	3,138 (2,469 – 3,989)	<0,0001
Diabetes	1,256	0,193	42,265	1	3,510 (2,404 – 5,126)	<0,0001
ADD1	-----	-----	6,252	2	-----	0,044
GW	0,047	0,117	0,163	1	1,048 (0,834 – 1,317)	0,687
WW	0,927	0,372	6,214	1	2,527 (1,219 – 5,239)	0,013
GNB3	-----	-----	7,027	2	-----	0,030
CT	0,292	0,113	6,673	1	1,339 (1,073 – 1,671)	0,010
TT	0,249	0,155	2,582	1	1,283 (0,947 – 1,739)	0,108
Constante	-0,620	0,106	34,269	1	0,538	<0,0001

*Método *Forward Wald* (SPSS vs. 19.0) em que saíram da equação as seguintes variáveis: sedentarismo; genes *ACE* 4340 e rs4343. B – Coeficiente de Beta; S.E. – *Standard error*; df – *degrees of freedom*; IC – Intervalo de confiança; Estatisticamente significativo para $p < 0.05$.

Elaborámos uma curva *ROC* e calculámos a *AUC* primeiramente com os FRT e, posteriormente, adicionámos os polimorfismos genéticos que, na análise univariada, se associaram com a HTA (Fig. 1). Verificamos que a adição dos 2 polimorfismos genéticos (*ADD1* e *GNB3*) aos FRT acrescentou um valor preditivo (*AUC*) de 0,668 para 0,681, com significado estatístico de acordo com o *Delong test* ($p=0,018$).



Discussão

Os nossos resultados mostram que as variantes genéticas *ADD1* rs4961, *GNB3* rs5443, *ACE* rs4340, *ACE* rs4343 são factores de susceptibilidade para a HTA na nossa população.

Duas dessas variantes, *ACE* rs4340 e rs4343, interferem no Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que tem um importante papel na regulação da pressão arterial, por regular a hemodinâmica renal e a volemia.¹⁸ Assim, os genes que codificam os componentes do SRAA são candidatos naturais ao desenvolvimento e progressão da HTA.¹⁹

O gene *ACE* localiza-se no cromossoma 17q23 e a sua variante *ACE* (rs4340), um polimorfismo de inserção/deleção (I/D) de uma sequência Alu de cerca de 287 pb no intrão 16, tem sido extensamente utilizado como marcador genético.

²⁰ A enzima conversora da angiotensina (*ACE*) tem um papel chave na geração da angiotensina II e degradação da bradicinina e através destas, afeta a morfologia e a reatividade da parede vascular, assim como a função renal. Os níveis plasmáticos individuais da *ACE* na população normal são reproduzíveis e estáveis, havendo no entanto uma ampla variabilidade inter-individual. O polimorfismo do gene *ACE* I/D rs4340 modula fortemente o nível de *ACE*

plasmática^{21,22}, sendo que cerca de metade dessa variabilidade pode ser explicada por este polimorfismo.²³ Alguns estudos descreveram o alelo D como fator de risco para HTA em várias populações.^{24,25} Numa amostra constituída por 3095 participantes do *Framingham Heart Study*, foi verificada uma associação do genótipo DD com aumento da PAD em homens, mas não em mulheres.²⁶ Num outro estudo populacional, o *locus* da *ACE* foi associado à PAD e à pressão arterial média em adolescentes, com idade média de 15 anos.²⁷ Numa meta-análise Zang *et al.*²⁸ reportou que o genótipo DD do polimorfismo *ACE* I/D associou-se com a hipertensão com um risco de 1,61 e através de modelos genéticos dominantes, recessivos e aditivos, também foram encontradas associações positivas.²⁸ No entanto, outros estudos não comprovam esta associação.²⁹⁻³¹

Assim, o presente estudo reforça, numa população portuguesa, o conceito de que o genótipo DD da *ACE* se associa, de forma significativa, com a HTA. O Odds Ratio encontrado foi, no entanto, relativamente baixo, na ordem de 1,2, o que sugere uma influência isolada relativamente modesta e pode explicar que noutros estudos, nomeadamente com amostras de dimensão inferior, esta diferença não atinja a significância.

Um outro polimorfismo do gene *ACE* (rs4343), uma substituição A/G na base 2350 do exão 17 (A2350G) foi estudado por Zhu *et al.*³² numa amostra populacional da Nigéria com 1343 indivíduos. Neste estudo, este polimorfismo associou-se a uma maior concentração de *ACE* plasmática e à pressão sanguínea.³² Saeed *et al.*³³ também concluiu que o genótipo *ACE* GG estava associado com o aparecimento de HTA (OR=1,06-3,07; p=0,02). Mas outros estudos apresentaram resultados inconclusivos³⁴. Na nossa população, confirmamos a importância do polimorfismo da *ACE* A2350G na HTA. Numa meta-análise com 1699 casos e 1274 controlos, Niu *et al.*³⁵, comparou o alelo 2350G com o alelo 2350A, concluindo que este conferiu um efeito protetor em relação à hipertensão (OR=0,81, IC 95% 0,56 - 1,18; p=0,28). Também concluiu que o alelo *ACE* 2350A, conferia uma redução significativa do risco de hipertensão nos muçulmanos do Golfo Árabe e do Paquistão e um risco elevado de HTA na população Chinesa Han³⁵.

O gene da alfa-2-macroglicina *ADD1* localizado no cromossoma 4p16.3 apresenta uma variante missense (rs4961) que consiste na substituição de uma glicina pelo

triptofano (G460W) que tem sido associada com o aumento da suscetibilidade de desenvolver Hipertensão,³⁶⁻⁴⁰ embora com resultados contraditórios.⁴¹⁻⁴³ A aducina é uma proteína heterodimérica do citoesqueleto, presente em muitos tecidos, com subunidades α , β e γ envolvidas no contacto célula a célula, transporte de iões da membrana celular e transdução de sinal. É uma das proteínas que regulam a actividade da Na⁺/K⁺-ATPase membranar.^{44,45} A variante genética *ADD1* 460W, leva à alteração da actina e têm demonstrado influenciar a expressão superficial e a velocidade máxima da Na⁺/K⁺-ATPase e subsequentemente uma mais rápida reabsorção de Na⁺ tubular renal e a um aumento da pressão sanguínea.⁴⁶ No presente trabalho, os polimorfismos da alfa-aducina, quer no modelo recessivo, quer no co-dominante, associaram-se a um risco importante de HTA, com um OR de 2,8. Numa população conhecida por ter elevado consumo de sal, faz sentido que estes polimorfismos possam ter impacto na reabsorção de Na⁺, e, conseqüentemente, no desenvolvimento de HTA. Vários investigadores descreveram uma associação do polimorfismo do gene *GNB3* (rs5443) com a HTA,⁴⁷⁻⁵⁰ mas outros estudos não confirmam este resultado.⁵¹⁻⁵² O gene *GNB3*, está localizado no cromossoma 12p13.⁵³ O polimorfismo *GNB3* rs5443 resulta dum *splicing* alternativo do exão 9 que elimina 41 aminoácidos na proteína, associando-se assim à expressão de uma nova variante truncada (G3-s) que se correlaciona com a ativação da proteína G.⁵⁴ Esta variante truncada é uma proteína funcional mas confere uma ativação aumentada das proteínas G, facilitando a sinalização intracelular.⁵⁴ Além do que, uma atividade aumentada da proteína G, aumenta a troca dos iões de Na⁺/H⁺ e associa-se a maiores níveis plasmáticos de Na⁺ e menores de potássio. Isto evidencia o papel dessas proteínas na patogénese da HTA.⁵⁵ O trabalho que apresentamos revela uma influência modesta destes polimorfismos no aparecimento da HTA, significativo nos modelos dominante e multiplicativo, com riscos na ordem de 1,2 a 1,4.

Adicionalmente, os nossos resultados mostram que, após análise de regressão logística, as variáveis que permaneceram na equação, demonstrando estarem associadas ao aparecimento de HTA de forma significativa e independente, foram a obesidade OR=3,138 (p<0.0001), hábitos etílicos OR=1,306 (p=0,013), diabetes OR=3,510 (p<0.0001) e os genótipos WW da *ADD1* rs4961 OR=2,527, (p=0,013) e o CT do *GNB3* rs5443 com OR=1,339 (p=0,010).

Curiosamente, os hábitos tabágicos aparecem como um fator protetor, ou seja, os indivíduos hipertensos apresentam uma menor percentagem de hábitos tabágicos ativos em relação aos controlos (19.7% vs. 26.2%; $p = 0,001$). Analisando a cessação tabágica, verificou-se uma maior percentagem nos hipertensos (14,7 vs. 6,1; $p < 0,0001$), o que nos leva a crer que, este resultado aparentemente paradoxal, possa ser explicado pela modificação de comportamento dos doentes hipertensos por intervenção médica.

Após elaboração da curva *ROC* e cálculo das *AUC* inicialmente só com os FRT e posteriormente adicionando as variantes *ADD1* rs4961, *GNB3* rs5443, *ACE* rs4340 e rs4343 aos FRT, verificámos ter havido um incremento no valor preditivo de HTA, relativamente ao existente só com os FRT, com significado estatístico ($p = 0,018$).

Estes resultados sugerem que a HTA é uma doença multifatorial, causada por fatores ambientais, genéticos e estilos de vida que interagem entre si e levam ao aparecimento desta patologia.

Pontos fortes e limitações do estudo

O presente estudo é o primeiro caso-controlo feito na população da Ilha da Madeira, uma população portuguesa, geneticamente homogénea⁵⁶⁻⁵⁸ e relativamente isolada, em que se investiga a associação de variantes genéticas anteriormente relacionadas por estudos de ligação génica ou por GWAS, com a suscetibilidade para a HTA essencial.

Esta população, com as características citadas, representa uma mais valia para o mapeamento de distúrbios raros e além disso, segundo vários investigadores, o estudo de populações culturalmente e geneticamente isoladas que apresentam um estilo de vida, hábitos alimentares e ambiente natural idênticos, pode reduzir a variação ambiental.⁵⁹

No entanto o nosso estudo avalia um número limitado de variantes genéticas associadas à HTA. A inclusão de mais variantes genéticas poderão reforçar ou acrescentar novos resultados.

Conclusões

Este estudo mostrou haver uma interação significativa entre as variantes genéticas *ADD1* rs4961, *GNB3* rs5443 e os fatores de risco tradicionais de HTA, como o tabaco, álcool, obesidade e diabetes, na capacidade preditiva de HTA. O presente estudo destaca a complexidade da HTA e demonstra a importância da interação entre fatores comportamentais e fatores genéticos no aparecimento da HTA.

Bibliografia

- 1 - [Lim SS](#), [Vos T](#), [Flaxman AD](#), [Danaei G](#), [Shibuya K](#), [Adair-Rohani H](#), et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. [Lancet](#). 2012;380:2224-60.
- 2 - Polonia J, Martins L, Pinto F, Nazaré J. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: changes over a decade. The PHYSA study. *J Hypertens*. 2014;32:1211–21.
- 3 - Camussi A, Bianchi G. Genetics of essential hypertension. From the unimodal-bimodal controversy to molecular technology. *Hypertension*. 1988;12:620-8.
- 4 - MacGregor GA. Sodium is more important than calcium in essential hypertension. *Hypertension*. 1985;7:628-40.
- 5 – Harrap SB. Genetic analysis of blood pressure and sodium balance in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1986; 8:572-82.
- 6 - Levy D, DeStefano AL, Larson MG, O'Donnell CJ, Lifton RP, Gavvas H, et al. Evidence for a gene influencing blood pressure on chromosome 17: genome scan linkage results for longitudinal blood pressure phenotypes in subjects from the Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2000;36:477-83.

- 7 - Allayee H, de Bruin TWA, Dominguez KM, Cheng LS-C, Ipp E, Cantor RM, et al. Genome scan for blood pressure in Dutch dyslipidemic families reveals linkage to a locus on chromosome 4p. *Hypertension*. 2001;38:773-8.
- 8 - Sharma P, Fatibene J, Ferraro F, Jia H, Monteith S, Brown C, et al. A genome-wide search for susceptibility loci to human essential hypertension. *Hypertension*. 2000;35:1291-6.
- 9 - Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ*. 2001;322:912–6.
- 10 - Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L. et al. Eight blood pressure loci identified by genome-wide association study of 34,433 people of European ancestry. *Nat Genet*. 2009;41(6): 666–76.
- 11 - [Levy D](#), [Ehret GB](#), [Rice K](#), [Verwoert GC](#), [Launer LJ](#), [Dehghan A](#), et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet*. 2009;41:677–87.
- 12 - Adeyemo A, Gerry N, Chen G, Herbert A, Doumatey A, Huang H, et al. A genome-wide association study of hypertension and blood pressure in African Americans. *PLoS Genet*. 2009;5(7):e1000564.
- 13 - Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, et al. [Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk](#). The International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies. *Nature*. 2011;478(7367):103–9.
- 14 - 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens*. 2003;21:1011-53.
- 15 - National Institute of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute North American Association for the Study of Obesity. The Practical Guide: Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. *NHLBI Obesity Education Initiative, NIH Publication Number: 00-4084*, 2000.

16 - Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2003;26:3160-7.

17 - 2016 European Guidelines on Cardiovascular disease prevention in clinical practice. Eur Heart J. 2016;37(29):2315-81.

18 – Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. American Journal of Hypertension. 1999; 12 (12 Pt 3): 205S-213S.

19 - Ruster C, Wolf G. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Progression of Renal Disease. J Am Soc Nephrol. 2006; 17(11):2985–91.

20 - Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism in the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). Nucleic Acids Res. 1992;20(6):1433.

21 - Cambien F, Costerousse O, Tiret L, Poirier O, Lecerf L, Gonzales MF, et al. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. Circulation. 1994;90(2):669-76.

22 - Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest. 1990;86(4):1343-6.

23 - Danser [AH](#), [Schalekamp MA](#), [Bax WA](#), [van den Brink AM](#), [Saxena PR](#), [Riegger GA](#), et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/ insertion polymorphism. Circulation. 1995; 92:1387- 8.

24 - Higashimori K, [Zhao Y](#), [Higaki J](#), [Kamitani A](#), [Katsuya T](#), [Nakura J](#), et al. Association analysis of a polymorphism of the angiotensin converting enzyme

gene with essential hypertension in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;191(2):399–404.

25 - Duru K, [Farrow S](#), [Wang JM](#), [Lockette W](#), [Kurtz T](#). Frequency of a deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is increased in African-Americans with hypertension. *Am J Hypertens.* 1994;7(8):759–62.

26 - O'Donnell CJ, [Lindpaintner K](#), [Larson MG](#), [Rao VS](#), [Ordovas JM](#), [Schaefer EJ](#), et al. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study [see comments]. *Circulation.* 1998;97(18):1766– 72.

27 - [Fornage M](#), [Amos CI](#), [Kardia S](#), [Sing CF](#), [Turner ST](#), [Boerwinkle E](#). Variation in the region of the angiotensin-converting enzyme gene influences interindividual differences in blood pressure levels in young white males [comment]. *Circulation.* 1998;97(18):1773–9.

28 - Lin-dan J, Li-na Z, Peng S, Ping W, Yue-miao Z, Wen-hua X et al. Association of angiotensinogen gene M235T and angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphisms with essential hypertension in Han Chinese population: a meta-analysis. [J Hypertens.](#) 2010;28(3):419-28.

29 - Jeunemaitre [X](#), [Lifton RP](#), [Hunt SC](#), [Williams RR](#), [Lalouel JM](#). Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet.* 1992;1:72–5.

30 - Gu XX, [Spaepen M](#), [Guo C](#), [Fagard R](#), [Amery A](#), [Lijnen P](#) et. al. Lack of association between the I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and essential hypertension in a Belgian population. *J Hum Hypertens* 1994;8:683–5.

31 - Chiang FT, Lai ZP, Chern TH, Tseng CD, Hsu KL, Lo HM et al. Lack of association of the angiotensin converting enzyme polymorphism with essential hypertension in a Chinese population. *Am J Hypertens.* 1997;10:197–201.

32 - Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, [McKenzie](#) CA. et al. Linkage and Association Analysis of Angiotensin I - Converting Enzyme (*ACE*)-Gene Polymorphisms with *ACE* Concentration and Blood Pressure. *Am J Hum Genet.* 2001;68:1139-48.

33 - Saeed MM, Saboohi K, Osman Ali S, Bokhari AM, Frossard PM. Association of the angiotensin-converting enzyme (*ACE*) gene G2350A dimorphism with essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2003;17(10):719-23.

34 - Niu W, Qi Y, Hou S, Zhai X, Zhou W, Qiu C. Haplotype -based association of the renin-angiotensin-aldosterone system genes polymorphisms with essential hypertension among Han Chinese: the Fangshan study. *J Hypertens.* 2009;27:1384-91.

35 - Niu W, Qi Y, Gao P, Zhu D. Association between angiotensin converting enzyme G2350A polymorphism and hypertension risk: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011; 12(1):8-14.

36 - Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, et al. Polymorphisms of alfa-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet.* 1997;349 (9062):1353–7.

37 - Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, Nakamura Y, Kinoshita M. Polymorphism of alpha-adducin in Japanese patients with essential hypertension. *Hypertens Res.* 1998;21:29–32.

38 - Casari G, Barlassina C, Cusi D, Zagato L, Muirhead R, Righetti M, et al. Association of the alfa adducin locus with Essential Hypertension. *Hypertension.* 1995;25:320-6.

39 - Barlassina C, Norton GR, Samani NJ, Woodwiss AJ, Candy GC, Radevski I, et al. Alpha-adducin polymorphism in hypertensives of South African ancestry. *Am J Hypertens.* 2000;13:719-23.

40 - Ju Z, Zhang H, Sun K, Song Y, Lu H, Hui R. et al. Alpha-adducin gene polymorphism is associated with essential hypertension in Chinese: a case-control and family-based study. *J Hypertens.* 2003;21:1861-8.

- 41 - Ishikawa K, Katsuya T, Sato N, Nakata Y, Takami S, Takiuchi S, et al. No association between alpha-adducin 460 polymorphism and essential hypertension in a Japanese population. *Am J Hypertens*. 1998;11:502–6.
- 42 - Larson N, Hutchinson R, Boerwinkle E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension*. 2000;35:1297-300.
- 43 - He X, Zhu DL, Chu SL, Jin L, Xiong MM, Wang GL, et al. Alfa-Adducin gene and essential hypertension in China. *Clin Exp Hypertens*. 2001;23:579-89.
- 44 - Kaiser HW, O'Keefe E, Bennett V. Adducin: Ca⁺⁺ - dependent association with sites of cell-cell contact. *J Cell Biol*. 1989;109:557-69.
- 45 - Tripodi G, Valtorta F, Torielli L, Chieriegatti E, Salardi S, Trusolino L, et al. Hypertension-associated point mutations in the adducin alpha and beta subunits affect actin cytoskeleton and ion transport. *J. Clin Invest*. 1996; 97:2815-22.
- 46 - Manunta P, Burnier M, D'Amico M, Buzzi L, Maillard M, Barlassina C, et al. Adducin polymorphism affects renal proximal tubule reabsorption in hypertension. *Hypertension*. 1999;33:694-7.
- 47 - Siffert W, Roskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, et al. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet*. 1998;18:45-8.
- 48 - [Benjafeld AV](#), [Jeyasingam CL](#), [Nyholt DR](#), [Griffiths LR](#), [Morris BJ](#). G-Protein beta3 subunit Gene (*GNB3*) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension*. 1998; 32:1094-7.
- 49 - [Li M](#), [Zhang B](#), [Li C](#), [Liu JL](#), [Wang LJ](#), [Liu Y](#), et al. G-protein beta 3 subunit polymorphisms and essential hypertension: a case-control association study in northern Han Chinese. *J Geriatr Cardiol*. 2015;12:127–34.
- 50 - Zheng H, Xu H, Cui B, Xie N, Wang Z, Luo M. Association between polymorphism of the G-protein β 3 subunit C825T and essential hypertension:

an updated meta-analysis involving 36,802 subjects. Biol Res. 2013. 46:265–73.

51 - [Brand E](#), [Herrmann SM](#), [Nicaud V](#), [Ruidavets JB](#), [Evans A](#), [Arveiler D](#), et al. The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit, beta 3 is not related to hypertension. Hypertension. 1999; 33: 1175-8.

52 - [Kato N](#), [Sugiyama T](#), [Morita H](#), [Kurihara H](#), [Yamori Y](#), [Yazaki Y](#). G protein beta3 subunit variant and essential hypertension in Japanese. Hypertension 1998; 32: 935-8.

53 - Levine MA, Modi WS, O'Brien SJ. Chromosomal localization of the genes encoding two forms of the G protein beta polypeptide, beta 1 and beta 3, in man. Genomics. 1990; 8:380-6.

54 - Siffert W. G Proteins, hypertension, and coronary heart disease - Novel findings and hypotheses. Kidney Blood Press Res. 1996;19:71-80.

55 - Siffert W, Düsing R. Sodium-proton exchange and primary hypertension: An update. Hypertension. 1995;26:649-55.

56 – [Gonçalves R](#), [Freitas A](#), [Branco M](#), [Rosa A](#), [Fernandes AT](#), [Zhivotovsky LA](#) et al. Y-chromosome lineages from Portugal, Madeira and Açores record elements of Sephardim and Berber ancestry. Ann Hum Genet. 2005;69:443–54.

57 - Brehm [A](#), Pereira L, Kivisild T, Amorim [A](#). Mitochondrial portraits of the Madeira and Açores archipelagos witness different genetic pools of its settlers. Hum Genet. 2003;114:77–86.

58 - [Kristiansson K](#), [Naukkarinen J](#), [Peltonen L](#). Isolated populations and complex disease gene identification. Genome Biol. 2008; 9:109.

59 – Jorde LB, Wooding SP. Genetic variation, classification and race. [Nat Genet](#). 2004;36(11 Suppl): S28-33.

ANEXO 4

Manuscript Details

Manuscript number	REPC_2017_117
Title	A VARIANTE GENÉTICA C825T DA SUBUNIDADE $\beta 3$ DA PROTEÍNA G ASSOCIA-SE COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL NUMA POPULAÇÃO PORTUGUESA THE GENETIC VARIANT C825T OF THE $\beta 3$ SUBUNIT OF G PROTEIN IS ASSOCIATED WITH ARTERIAL HYPERTENSION IN A PORTUGUESE POPULATION
Short title	Polimorfismo do gene GN $\beta 3$ e a hipertensão arterial Polymorphism of GN $\beta 3$ gene and Arterial Hypertension
Article type	Original article

Abstract

A Hipertensão Arterial é um importante problema de Saúde Pública, afetando 25% da população adulta mundial. Factores genéticos e ambientais contribuem para a sua patogénese. O polimorfismo C825T da subunidade $\beta 3$ da Proteína G (rs5443) favorece a produção de uma variante alternativa, truncada, que facilita a sinalização intracelular, podendo interferir na regulação da Pressão Arterial. Esta variante genética tem sido descrita como fator de risco para a Hipertensão, com resultados controversos. Objectivos: O objectivo deste estudo foi avaliar a associação do polimorfismo C825T do gene GN $\beta 3$ com o aparecimento de Hipertensão Arterial, numa População Portuguesa do Arquipélago da Madeira. Métodos: Com uma amostra de 1641 indivíduos (idade média de 50,6 $\pm$ 8,1 anos), fizemos um estudo caso-controlo com 848 indivíduos com Hipertensão Arterial e 793 controlos, ajustados em termos de sexo e idade. Todos os participantes colheram sangue para análises bioquímicas e foram genotipados para o polimorfismo C825T. Foi feita a análise de regressão logística para ver quais as variáveis que se relacionam com o aparecimento de Hipertensão. A análise dos dados foi feita através da utilização do software estatístico SPSS, versão 19.0. Usamos como limiar de significância o valor de $p < 0,05$. Resultados: No nosso estudo, encontramos associação significativa entre o polimorfismo C825T e o aparecimento de Hipertensão (Odds Ratio= 1.275; 95% IC (1.042 - 1.559); $p = 0.018$) no modelo dominante, após análise multivariada. Conclusão: Concluímos que o polimorfismo C825T da subunidade $\beta 3$ da Proteína G está associado, de forma significativa e independente, com o aparecimento hipertensão na nossa população. Arterial Hypertension is an important public health problem, affecting about 25% of the world's adult population. Genetic and environmental factors contribute to its pathogenesis. The polymorphism of the $\beta 3$ subunit of the G protein (C825T, rs5443) favors the production of an alternative, truncated variant that enables intracellular signaling and may interfere with the regulation of blood pressure. This genetic variant has been described as a risk factor for arterial hypertension, with controversial results. Objective: The objective of this study was to evaluate the association of the C825T polymorphism of the GN $\beta 3$ gene, with the appearance of Arterial Hypertension in a Portuguese population from Madeira Archipelago. Methods: A case-control study with 1641 Caucasian individuals (mean age of 50.6 $\pm$ 8.1 years) was performed with 848 subjects with EH and 793 controls. All participants collected blood for biochemical and genetic analysis, including the genotyping of the GN $\beta 3$ C825T polymorphism. A logistic regression analysis was performed to verify which variables were significantly associated EH onset. Statistical analyses were performed using SPSS version 19.0 and p-values were statistically significant for $p < 0.05$. Results: In our study, we found a significant association between the polymorphism C825T of the GN $\beta 3$ gene and the appearance of EH (Odds Ratio= 1.275; 95% CI (1.042 – 1.559); $p = 0.018$) in the dominant model, after multivariate analysis. Conclusion: With our results, we conclude that the polymorphism C825T of the $\beta 3$ Subunit of the G Protein is associated, in a significant and independent way, with the appearance of EH in our population.

Keywords	Estudo caso-controlo; Hipertensão Arterial; Polimorfismos; Proteína G; GN $\beta 3$ Case-control study; Arterial Hypertension; G Protein; Polymorphisms; GN $\beta 3$
Corresponding Author	Ana Célia Sousa
Corresponding Author's Institution	Hospital Dr Nélio Mendonça, Unidade de Investigação
Order of Authors	Ana Célia Sousa, Roberto Palma dos Reis, Andreia Pereira, Sofia Borges, Sara Gouveia, Adelaide Spínola, Ana Isabel Freitas, Graça Guerra, Teresa Góis, Mariana Rodrigues, Eva Henriques, Ilídio Ornelas, Carolina Freitas, Décio Pereira, António Brehm, Maria Isabel Mendonça

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.docx [Cover Letter]

Primeira página.docx [Author Agreement]

Responsabilidades_eticas.docx [Ethical Statement]

Proteína G_final.docx [Manuscript File]

Figura 1.jpg [Figure]

Tabela 1.docx [Table]

Tabela 2.docx [Table]

Tabela 3.docx [Table]

Tabela 4.docx [Table]

Tabela 5.docx [Table]

Tabela 6.docx [Table]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Exmo Sr Editor-Chefe da
Revista Portuguesa de Cardiologia

Estamos a submeter à Revista Portuguesa de Cardiologia um manuscrito intitulado «A variante genética C825T da subunidade $\beta 3$ da proteína G associa-se com a Hipertensão Arterial numa População Portuguesa" para possível avaliação.

O nosso estudo é um estudo de caso-controlo e teve como principal objetivo avaliar a associação do polimorfismo da Proteína G (GN $\beta 3$ C825T, rs5443), com o aparecimento de Hipertensão Arterial (HTA), numa população portuguesa do Arquipélago da Ilha da Madeira.

Os nossos resultados mostraram que o polimorfismo da subunidade $\beta 3$ da Proteína G C825T está associado, de forma significativa e independente, com o aparecimento HTA na nossa população.

Dado a HTA ser uma patologia multifactorial resultante de factores ambientais e genéticos e das suas interações, o conhecimento dos polimorfismos genéticos que se associam ao seu aparecimento tem suma importância.

Este é o primeiro estudo a ser publicado sobre o polimorfismo do gene GN $\beta 3$ C825T e a sua associação com a HTA, na população da Ilha da Madeira. O facto deste estudo ter sido feito na Ilha da Madeira, com uma população homogênea e isolada, pode ser uma mais valia para o mapeamento genético de distúrbios raros, além do que, segundo vários pesquisadores, o estudo de populações culturalmente e geneticamente isoladas que apresentam um modo de vida, hábitos alimentares e ambiente natural idênticos, pode reduzir a variação ambiental.

O conhecimento genético e das suas associações, podem ser a base para descobertas farmacológicas importantes para a terapêutica da HTA e de muitas outras doenças.

Além disso, confirmamos que todos os autores aprovaram este manuscrito e estão cientes de sua submissão à Revista Portuguesa de Cardiologia.

O autor correspondente
Ana Célia Sousa

**A VARIANTE GENÉTICA C825T DA SUBUNIDADE $\beta 3$ DA PROTEÍNA G
ASSOCIA-SE COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL NUMA POPULAÇÃO
PORTUGUESA**

**THE GENETIC VARIANT C825T OF THE $\beta 3$ SUBUNIT OF G PROTEIN
IS ASSOCIATED WITH ARTERIAL HYPERTENSION IN A PORTUGUESE
POPULATION**

Ana Célia Sousa^{*1}, Roberto Palma dos Reis², Andreia Pereira¹, Sofia Borges¹, Sara Gouveia¹, Adelaide Spínola¹, Ana Isabel Freitas^{1,3}, Graça Guerra^{1,3}, Teresa Góis¹, Mariana Rodrigues¹, Eva Henriques¹, Ilídio Ornelas¹, Carolina Freitas¹, Décio Pereira¹, António Brehm³, Maria Isabel Mendonça¹

^{*}autor correspondente

Ana Célia Sousa

Email: dep.card@sesaram.pt

Phone: +351-291-709600

Fax: +351-291-709677

¹Unidade de Investigação, Hospital Doutor Nélcio Mendonça

Avenida Luís de Camões, n.º 57

9004-514 Funchal - Madeira

Portugal

²Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Campo dos Mártires da Pátria, n.º 130

1169-056 Lisboa

Portugal

³Laboratório de Genética Humana, Universidade da Madeira

Campus da Penteada

9020-105 Funchal

Portugal

Número total de palavras do manuscrito: 4919

Responsabilidades éticas

Proteção de pessoas e animais. Os autores declaram que para esta investigação não se realizaram experiências em seres humanos e/ou animais.

Confidencialidade dos dados. Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de pacientes.

Direito à privacidade e consentimento escrito. Os autores declaram ter recebido consentimento escrito dos pacientes e/ ou sujeitos mencionados no artigo. O autor para correspondência deve estar na posse deste documento.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59

Resumo

Introdução: A Hipertensão Arterial é um importante problema de Saúde Pública, afectando 25% da população adulta mundial. Factores genéticos e ambientais contribuem para a sua patogénese. O polimorfismo C825T da subunidade $\beta 3$ da Proteína G (rs5443) favorece a produção de uma variante alternativa, truncada, que facilita a sinalização intracelular, podendo interferir na regulação da Pressão Arterial. Esta variante genética tem sido descrita como factor de risco para a Hipertensão, com resultados controversos.

Objectivos: O objectivo deste estudo foi avaliar a associação do polimorfismo C825T do gene GN $\beta 3$ com o aparecimento de Hipertensão Arterial, numa População Portuguesa do Arquipélago da Madeira.

Métodos: Com uma amostra de 1641 indivíduos (idade média de 50,6 $\pm$ 8,1 anos), fizemos um estudo caso-controlo com 848 indivíduos com Hipertensão Arterial e 793 controlos, ajustados em termos de sexo e idade. Todos os participantes colheram sangue para análises bioquímicas e foram genotipados para o polimorfismo C825T. Foi feita a análise de regressão logística para ver quais as variáveis que se relacionam com o aparecimento de Hipertensão. A análise dos dados foi feita através da utilização do *software* estatístico SPSS, versão 19.0. Usamos como limiar de significância o valor de $p < 0,05$.

Resultados: No nosso estudo, encontramos associação significativa entre o polimorfismo C825T e o aparecimento de Hipertensão (Odds Ratio= 1.275; 95% IC (1.042 - 1.559); $p = 0.018$) no modelo dominante, após análise multivariada.

Conclusão: Concluimos que o polimorfismo C825T da subunidade $\beta 3$ da Proteína G está associado, de forma significativa e independente, com o aparecimento hipertensão na nossa população.

Palavras-chave: Estudo caso-controlo; Hipertensão Arterial; Polimorfismos; Proteína G; GN $\beta 3$

Abstract

Arterial Hypertension is an important public health problem, affecting about 25% of the world's adult population. Genetic and environmental factors contribute to its pathogenesis.

The polymorphism of the $\beta 3$ subunit of the G protein (C825T, rs5443) favors the production of an alternative, truncated variant that enables intracellular signaling and may interfere with the regulation of blood pressure. This genetic variant has been described as a risk factor for arterial hypertension, with controversial results.

Objective: The objective of this study was to evaluate the association of the C825T polymorphism of the GN β 3 gene, with the appearance of Arterial Hypertension in a Portuguese population from Madeira Archipelago.

Methods: A case-control study with 1641 Caucasian individuals (mean age of 50.6 ± 8.1 years) was performed with 848 subjects with EH and 793 controls. All participants collected blood for biochemical and genetic analysis, including the genotyping of the GN β 3 C825T polymorphism. A logistic regression analysis was performed to verify which variables were significantly associated EH onset. Statistical analyses were performed using SPSS version 19.0 and p-values were statistically significant for $p < 0.05$.

Results: In our study, we found a significant association between the polymorphism C825T of the GN β 3 gene and the appearance of EH (Odds Ratio= 1,275; 95% CI (1,042 - 1,559); $p = 0,018$) in the dominant model, after multivariate analysis.

Conclusion: With our results, we conclude that the polymorphism C825T of the $\beta 3$ Subunit of the G Protein is associated, in a significant and independent way, with the appearance of EH in our population.

Keywords: Case-control study; Arterial Hypertension; G Protein; Polymorphisms; GN β 3

INTRODUÇÃO

A Hipertensão arterial (HTA) é um importante problema de saúde pública, afectando cerca de 25% população adulta mundial¹. É um factor de risco de doença Cardiovascular e de progressão para insuficiência renal, independentemente de outros factores de risco vascular^{2,3}. Na População adulta portuguesa, a sua prevalência global é de cerca de 42% (44,4% nos homens e 40,2% nas mulheres)⁴. Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido feitos no sentido de esclarecer qual o contributo genético no desenvolvimento da HTA. Sabe-se que cerca de 20-40% da variação da pressão arterial é determinada geneticamente^{5,6}. No entanto, a genética molecular da HTA ainda permanece pouco esclarecida.

As proteínas G e seus receptores têm um papel crucial na sobrevivência celular. Estas proteínas fazem parte duma superfamília de proteínas que, no estado inactivo, encontram-se acopladas a receptores da membrana celular. Quando activadas, por estímulos adequados, graças a propriedades funcionais e estruturais, migram pelo citosol activando múltiplos efetores, como sejam enzimas, canais iónicos, hormonas, neurotransmissores, quimiocinas e factores autócrinos e parácrinos⁷ consumando a transmissão de sinais. Este é um processo de activação dos eventos intracelulares por estímulos externos.

A transdução de estímulos externos em sinais intracelulares é comprovadamente um dos factores de grande importância para a perpetuação das características viáveis na escala evolutiva. Tendo em vista o seu papel abrangente, a deficiência da expressão ou formas alteradas destas importantes proteínas podem levar a distúrbios metabólicos globais ou restritos. Doenças humanas, incluindo endócrinas, neoplasias e cardiovasculares, são reconhecidas actualmente como consequência, em parte, do comprometimento da expressão ou função das proteínas G⁸.

As proteínas G têm uma estrutura heterotrimérica, composta por 3 subunidades denominadas alfa (α), beta (β) e gama (γ), codificadas por genes distintos. A subunidade alfa (α) é a mais característica de cada proteína G e é esta subunidade que interage com o receptor, ligando-se ao GTP e regula os sistemas efetores⁹. As subunidades β e γ estão associadas por ligações não covalentes e, quando se encontram ligadas à subunidade α , configuram o estado inactivo da Proteína G¹⁰. O dímero β e γ , para além de servir para ancorar a subunidade α , também têm influência em processos celulares específicos^{11,12} e pode modular a actividade de determinados efetores¹³. Devido ao seu papel crucial na função de muitos tipos de células, as anormalidades genéticas nas subunidades das proteínas G têm o potencial de estarem envolvidas na etiologia de uma vasta gama de situações clínicas.

O polimorfismo genético da subunidade $\beta 3$ da Proteína G (C825T) rs5443, situa-se no exão 10 do gene GNB3, e apresenta substituição da citosina (C) pela timidina (T) no nucleótido 825, o que induz à formação dum «splicing» alternativo dentro do exão 9, no qual os nucleótidos 498-620 são eliminados^{14,15}. Como resultado os aminoácidos 167 a 197 estão ausentes na proteína codificada (designada G $\beta 3$ -s). Esta variante truncada «splice» - G $\beta 3$ -s é uma proteína funcional que confere uma activação aumentada das proteínas G, facilitando a sinalização intracelular^{14,16}. Esta variante genética foi descrita como associada a várias patologias, nomeadamente HTA^{14,15,17-20}, obesidade²¹, depressão²² e doenças cardiovasculares²³. Em outros estudos, no entanto, não se demonstrou a associação desta variante genética com a HTA²⁴⁻²⁶.

Havendo estudos que confirmam e outros que rejeitam a ligação do polimorfismo da subunidade $\beta 3$ da Proteína G C825T e a HTA, justifica-se avaliar a sua eventual associação numa população portuguesa.

OBJECTIVO

Avaliar a eventual associação do polimorfismo C825T da Proteína G (GN β 3, rs5443), com o aparecimento de HTA, numa População Portuguesa do Arquipélago da Madeira.

MÉTODOS

Protocolo do estudo e aprovação ética:

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Central do Funchal e realizado de acordo com as orientações apresentadas na Declaração de Helsínquia. O consentimento informado por escrito foi obtido de cada participante, incluindo permissão explícita para as análises de ADN e a coleta de dados clínicos relevantes.

População do Estudo:

Este estudo foi feito no Arquipélago da Madeira - Portugal, cuja população é de cerca de 300.000 habitantes. Os indivíduos participantes no estudo são de raça caucasiana, naturais do Arquipélago da Madeira e os seus progenitores (1ª e 2ª geração) são também nascidos neste arquipélago e da mesma raça. Procuramos desta forma, que esta população de indivíduos fosse geneticamente homogénea e representasse assim uma população da Europa do Sul.

Com uma amostra de 1641 indivíduos com idade média $50,6 \pm 8,1$, 848 (49,9%) eram do género masculino, seleccionados sequencialmente das consultas de Medicina Geral e Familiar e da Consulta de Medicina Interna do Hospital Central do Funchal.

Constituímos dois grupos, com a nossa amostra, consoante tinham ou não Hipertensão Arterial, procurando que não houvesse diferenças significativas entre ambos os grupos em termos de sexo e idade.

Hipertensão Arterial:

A Hipertensão Arterial foi considerada quando os indivíduos à entrada no estudo já estavam diagnosticados e/ou cumpriam medicação anti-hipertensiva há mais de 3 meses ou ainda eram hipertensos recém-diagnosticados com Pressão Arterial Sistólica (PAS) e/ou Pressão Arterial Diastólica (PAD) $\geq 140/90$ mmHg, avaliada em pelo menos 3 ocasiões²⁷.

Foram excluídos todos os indivíduos com hipertensão secundária, tais como hiperaldosteronismo primário ou doença renal clinicamente relevante e os que receberam medicação para outras indicações que pode afectar a pressão arterial.

Os controlos, normotensos nunca tinham feito medicação anti-hipertensiva e apresentavam PAS/PAD $< 140/90$ mmHg.

Foi avaliada a pressão arterial a todos os indivíduos, após 10 min de repouso, em posição sentada, no braço direito utilizando um esfigmomanómetro Welch Allyn padrão (fases I a V) e foi registada a média de 3 leituras feitas com intervalo de 2 min²⁷.

Recolha de dados:

Todos os participantes responderam a um questionário padronizado em relação à idade, sexo, estilo de vida, tabagismo, consumo de álcool e terapêutica medicamentosa.

Foram avaliados, em todos os participantes, a altura em centímetros e o peso em kilogramas e calculado o Índice de Massa Corporal (IMC) utilizado a formula (kg / m^2) ²⁸.

355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413

A Diabetes foi definida por um nível de glicose em jejum ≥ 126 mg / dl e /ou um nível de glicose ≥ 200 mg / dl e / ou uma história de tratamento para diabetes²⁹.

Sedentarismo foi definido quando os indivíduos não praticavam pelo menos 150 minutos/ semana de actividade física moderada a vigorosa³⁰.

A obesidade foi definida com um índice de massa corporal (IMC) > 30 kg/m^{28,30}.

Considerou-se fumadores aqueles que à data da entrada no estudo tinham hábitos tabágicos e alcoolismo quando tinham hábitos alcoólicos à entrada do estudo.

Análise bioquímica:

As amostras de sangue foram extraídas após 14-16 horas de jejum e o plasma foi preparado para a quantificação dos perfis biológicos. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório Central do Hospital, de acordo com as técnicas usuais.

Para determinar o colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos e glucose, as amostras de sangue foram colocadas em tubos secos, centrifugadas durante meia hora a 3500 g e posteriormente quantificadas por uma técnica enzimática utilizando um analisador automático "AU 5400" (Beckman Coulter). Os marcadores bioquímicos de risco: lipoproteína (a), apolipoproteína B e a Proteína C reactiva de alta sensibilidade (PCR-as) foram quantificados por um aparelho automático "AU 5400" (Beckman Coulter) pela técnica de Imunoturbidimetria. Em relação ao Fibrinogénio a colheita também foi feita com o doente em jejum, para um tubo com citrato de sódio, utilizando-se um analisador automático "ACL TOP 700".

Análise genética do polimorfismo C825T do gene GN β 3:

O ADN genómico foi extraído das células leucocitárias do sangue periférico usando o método de "salting-out". A análise genotípica foi efectuada usando sondas oligonucleotídicas marcadas com

414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472

fluorescência específica para cada um dos alelos num ensaio que combina a técnica convencional de PCR e a técnica TaqMan (Applied Biosystems). Os "primers" e as sondas foram as pré-estabelecidas pelo fornecedor (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems) para o polimorfismo C825T do gene GN β 3 (rs5443), os oligonucleótidos foram sintetizados e os marcadores fluorogénicos FAM e VIC acoplados às extremidades 5' das sondas de modo a alcançar a discriminação alélica. A reacção de polimerização em 2 passos consistia em 40 ciclos de desnaturação a 92°C durante 15 segundos e de "primer annealing" e extensão a 60°C durante 1 minuto e foi efectuada num aparelho 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os genótipos foram determinados recorrendo ao 7300 System SDS Software (Applied Biosystems) sem qualquer conhecimento prévio dos dados clínicos individuais (Figura 1).

Análise estatística:

As variáveis categóricas são apresentadas pela frequência e a sua respectiva percentagem, usando o teste de qui-quadrado. As variáveis contínuas são expressas com a média $\pm$ desvio padrão ou mediana (mínimo – máximo). Para comparar as variáveis contínuas foram usados os testes t de Student ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, conforme apropriado.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado para cada um dos genes usando o teste de qui-quadrado. Um valor de p inferior a 5% foi considerado estatisticamente significativo, enquanto o valor Pb (p dividido pelo número total de comparações) foi considerado após a correcção de Bonferroni.

Para determinar, por análise multivariada, quais as variáveis associadas ao aparecimento de HTA, foi elaborada uma regressão logística usando o método Forward Wald.

473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531

Os dados estatísticos foram analisados usando o software estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 19.0. Usamos como limiar de significância o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características dos participantes do estudo:

A população estudada é composta por 1641 indivíduos, sendo 848 casos com HTA, com idade média de $50,8 \pm 8,1$, sendo 51,8% do sexo masculino, e 793 controles sem HTA, com idade média de $50,3 \pm 8,2$ (47,9% do sexo masculino). As variáveis gênero e idade foram ajustadas entre os grupos.

Apresentamos as características basais dos participantes do estudo na Tabela 1. Comparando o grupo dos casos com o dos controles, verifica-se que houve diferença significativa em relação às seguintes variáveis: consumo de álcool ($p = 0,008$), IMC ($p < 0,0001$), Obesidade ($p < 0,0001$), Diabetes ($p < 0,0001$), Dislipidemia ($p < 0,0001$), Pressão Arterial Sistólica ($p < 0,0001$), Pressão Arterial Diastólica ($p < 0,0001$) e Frequência cardíaca ($p < 0,001$) que eram mais frequentes ou apresentaram valores médios mais elevados no grupo dos hipertensos em relação aos controles.

Constatou-se também haver uma maior percentagem de fumadores no grupo dos controles em relação ao grupo dos hipertensos e com significância estatística ($p < 0,0001$).

Em relação às variáveis bioquímicas (Tabela 2), houve diferença significativa entre ambos os grupos em relação à Hemoglobina ($p < 0,0001$), Leucócitos ($p < 0,0001$), Fibrinogénio ($p < 0,0001$), HDL-Colesterol ($p < 0,0001$), Triglicérideos ($p < 0,0001$), Apolipoproteína B ($p < 0,0001$), Glicose em jejum ($p < 0,0001$) e PCR (as) ($p < 0,0001$) que também apresentaram valores médios mais elevados no grupo dos hipertensos em relação aos controles. Em relação às variáveis Colesterol total, LDL-Colesterol, Lipoproteína (a) e Plaquetas não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590

Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo genético GNβ3 C825T e risco de HTA:

Apresentamos as frequências dos alelos do polimorfismo genético C825T do gene GNβ3 na Tabela 3. A frequência dos alelos C e T do polimorfismo GNB3 C825T na população total da nossa amostra foi de 60,5% e de 39,5% respectivamente. No grupo dos casos e controles seguiu a mesma tendência, atingindo um valor de OR de 1.106, mas sem significância estatística ($p=0.158$) (Tabela 3).

A frequência de cada genótipo em ambos os grupos, casos e controles, foi encontrada em conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4). O genótipo mais frequente, no modelo aditivo, foi o heterozigoto CT, que apresentou valores de 50,7% e 44,3% nos casos e controles, respectivamente, quando comparado com o genótipo homozigoto de referência CC. Este genótipo acarretou um risco maior de 1.336 ($p=0.008$), em relação ao homozigoto mutado (OR=1.107; $p=0.494$) (Tabela 4).

No modelo dominante (Tabela 5), os indivíduos com genótipo (CT ou TT) tinham um maior risco de desenvolver hipertensão arterial com um OR de 1,275 (IC 95% (1,042-1,559)) quando comparados com o genótipo de referência (CC) e com significância estatística ($p=0,018$).

Análise de regressão logística:

Foi feita uma análise de regressão logística (Tabela 6), sendo que as variáveis que permaneceram na equação foram: diabetes, obesidade, consumo de álcool, e os genótipos CT e TT do polimorfismo GNβ3, associando-se de forma significativa e independente ao aparecimento de HTA (Tabela 6).

Os hábitos tabágicos surgem na equação como variável protectora em relação ao aparecimento de HTA. O sedentarismo saiu da equação, não influenciando o aparecimento de HTA (Tabela 6).

DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos a existência duma associação entre a variante GN β 3 825T da Proteína G e a HTA, numa população portuguesa do Arquipélago da Madeira. Os indivíduos com o modelo genético dominante, apresentaram maior risco de desenvolver HTA (Odds Ratio de 1,275 95% IC (1,042-1,559), $p=0,018$), mesmo após a análise multivariada, com correcção para os factores de confusão (Obesidade, diabetes, sedentarismo, ingestão de álcool e hábitos tabágicos). Estes resultados demonstram que, nesta população, as variantes da Proteína G se associam à HTA de forma independente dos factores de risco de HTA já conhecidos, ou seja, acrescentam risco de HTA aos factores de risco tradicionais.

Na nossa população, a frequência encontrada para o alelo T foi de 39,5% nesta população, o que é superior à relatada em outras populações de raça caucasiana (37,7%), sendo inferior à descrita para os asiáticos (48,4%) e para os afro-americanos (76,3%)¹⁸.

Os presentes resultados, inovadores na população portuguesa, vão na sequência de alguns estudos com resultados semelhantes.

Pela primeira vez, Siffert et al 1998¹⁴ num estudo com 426 pacientes demonstrou uma associação significativa do polimorfismo no gene β 3 da proteína G sensível à toxina pertússis (GN β 3) com a HTA, (OR 1,79; 95% IC= 1,05 -3,05; $p= 0,03$) numa população da Alemanha. Posteriormente, muitos estudos a nível mundial e em diferentes grupos étnicos, encontraram associação entre o polimorfismo do GN β 3 C825T com a HTA^{14,15,17-20} ou com a variação da pressão arterial³¹⁻³³.

Adam et al. 1998¹⁵ em estudo realizado na raça caucasiana concluiu que a variante GN β 3 825T da Proteína G se associava com HTA (OR = 2,3; 95% IC= 1,7-3,3)¹⁵.

Também numa população Egípcia encontrou-se a associação desta variante genética com a HTA (OR= 1,4; 95%CI (0,9-2,1)) no modelo genético dominante e que aumentava significativamente no modelo recessivo (OR=2,3; 95% IC (1,5-3,7))²⁰.

650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708

Zheng H. et al¹⁸ numa meta-análise que envolveu 36.802 indivíduos, confirmou uma associação significativa entre o polimorfismo GNβ3 (C825T) e o risco global de HTA em caucasianos e chineses, mas essa associação não foi comprovada noutras populações asiáticas¹⁸.

Em contraponto, Guo et al. 2013²⁶ numa meta-análise realizada, sugeriu pela análise global das evidências que o alelo GNβ3 825T pode ser um bom indicador de risco de hipertensão, mas no entanto não evidenciou nenhuma associação com a HTA em asiáticos e caucasianos²⁶.

Vários mecanismos fisiopatológicos poderão justificar o papel importante da variante genética GNβ3 C825T rs5443, no desenvolvimento de HTA.

Siffert et al. 1998¹⁴ descreve que a variante truncada «splice» - Gβ3-s é uma proteína funcional que provoca uma atividade aumentada das proteínas G nos sistemas reconstituídos, promovendo melhor sinalização intracelular¹⁴.

Uma pressão arterial mais elevada, deve-se ao facto duma maior sensibilidade às hormonas pressores vasoactivos, aquelas que transmitem os seus sinais através de proteínas GNβ3³⁴.

Este conceito é demonstrado em estudos *in vivo*, provado pelo facto dos indivíduos portadores da variante genética GNβ3 825T, terem maior reactividade vascular na estimulação de receptores α1 - adrenérgicos coronários³⁵.

Meirhaeghe et al. 2001¹⁶ avaliou a vasomotilidade das artérias coronárias em resposta à injeção intravenosa dum fármaco vasoconstritor (metil-ergonovina), concluindo que os indivíduos portadores de pelo menos um alelo T do GNβ3 825T apresentaram maior susceptibilidade à vasoconstrição, em resposta ao vasoconstritor, quando comparados com os do genótipo selvagem CC. A subunidade Gβ3-s, que está associada a aumento da actividade desta proteína podendo, portanto, incrementar a actividade do α1A-adrenoreceptor acoplado às proteínas G, explicando a maior vasoconstrição observada em resposta ao fármaco vasoconstritor, em indivíduos com o alelo GNβ3 825T.

709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767

Outra hipótese defendida por Siffert et al 1998¹⁴ de que o início da hipertensão nos portadores do alelo T do GN β 3, poderá não se dever à vasoconstrição aumentada por hormonas vasoconstritoras como a noradrenalina e a angiotensina II que activam heterotrimeros das Proteínas G não sensíveis à toxina pertússis, mas sim resultar da proliferação das células musculares lisas vasculares que levam gradualmente à hipertrofia vascular¹⁴.

Realizámos na nossa população uma análise de regressão logística onde foram estudadas as variáveis de confundimento como sejam, obesidade, diabetes, hábitos alcoólicos, tabagismo e o modelo genético dominante do polimorfismo GN β 3, a fim de avaliar quais as variáveis que se relacionavam de forma significativa e independente com o aparecimento da Hipertensão Arterial. A obesidade e a diabetes são variáveis que conferiram risco significativo de aparecimento de HTA com um odds ratio de 3,270 (2,555 - 4,184) $p < 0.0001$ e 3.397 (2.275 - 5.074) $p < 0.0001$ respectivamente. O polimorfismo GN β 3 também se manteve na equação, com odds ratio de 1,276 (1,024 - 1,566) $p = 0,029$, o que demonstra que se associa de forma significativa e independente com o aparecimento de HTA.

Segundo os resultados do nosso estudo no grupo dos Controlos havia uma maior percentagem de indivíduos com hábitos tabágicos do que no grupo dos Hipertensos (26,6% versus 19,3%, respectivamente). Após a análise multivariada, os hábitos tabágicos surgiram na equação como variável protectora em relação ao aparecimento de HTA. Isto deve-se ao facto de ser considerado ter hábitos tabágicos aquando à entrada do estudo, portanto os indivíduos que eram fumadores activos e não aqueles que tinham tido história de hábitos tabágicos. Salieta-se o facto dos indivíduos Hipertensos, à entrada do estudo, já estavam a ser seguidos em consultas médicas, em abordagem geral do risco cardiovascular, o que terá levado a que alguns deixassem de fumar.

Sabemos que a Obesidade é também um importante factor de risco para o desenvolvimento de HTA. Estudos transversais demonstram que obesidade está associada a níveis mais elevados de

pressão arterial (PA), de ganho de peso, ao longo da vida e é um importante preditor de desenvolvimento de HTA³⁶⁻³⁹. Vários estudos, em populações de várias etnias, demonstraram a associação do alelo T do polimorfismo GNB3 com a obesidade⁴⁰⁻⁴¹ o que pode afectar as variações da pressão arterial⁴²⁻⁴³.

Outros estudos que correlacionem a anormalidade dos complexos mecanismos transdutores a nível celular com outros processos patológicos, podem ser a base para descobertas farmacológicas importantes para a terapêutica da HTA e de muitas outras doenças.

Pontos fortes do estudo:

O presente estudo é o primeiro estudo caso-controlo feito na população da Ilha da Madeira, uma população portuguesa, geneticamente homogénea⁴⁴⁻⁴⁶ e relativamente isolada, em que se investiga a associação do polimorfismo GNB3 C825T com a susceptibilidade para a HTA

Esta população, com as características citadas, representa uma mais-valia para o mapeamento de distúrbios raros e além disso, segundo vários pesquisadores, o estudo de populações culturalmente e geneticamente isoladas que apresentam um modo de vida, hábitos alimentares e ambiente natural idênticos, pode reduzir a variação ambiental⁴⁷.

CONCLUSÃO

No estudo, o polimorfismo GNB3 C825T associou-se de forma significativa e independente, com o aparecimento Hipertensão Arterial, numa população portuguesa (Odds Ratio de 1,275 95% IC (1,042 - 1,559), p=0,018) no modelo dominante mesmo após análise de regressão logística, onde foram estudadas outras variáveis que podem também associar-se ao aparecimento de HTA.

827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885

O estudo, a identificação de genes candidatos e a compreensão da sua função, contribuem para o estabelecimento duma base molecular específica para HTA. Serão necessários mais estudos com tamanhos de amostra maiores, em diferentes populações para determinar se o polimorfismo GNB3 C825T desempenha um papel relevante na etiologia da HTA.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pelo Programa Operacional de Valorização do Potencial Económico e Coesão Territorial da Região Autónoma da Madeira (INTERVIR+).

BIBLIOGRAFIA

- 1- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, 2005; 365:217-23.
- 2- National Heart, Lung and Blood Institute. Factbook fiscal year 1966. Bethesda, Md: NHLBI.
- 3- Lewington S, Clarke P, Qizilbash N, et al. Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*, 2002; 360:1903-13.
- 4- Polónia J, Martins L, Pinto F, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: changes over a decade. The PHYSA study. *J Hypertens*, 2014; 32:1211-21.
- 5- Gong M, Hubner N. Molecular genetics of human hypertension. *Clin Sci*, 2006; 110:315-26.
- 6- Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science*, 1996; 272:676-80.
- 7- Neves SR, Ram PT, Lyengar R. G protein pathway. *Science*, 2002; 296:1636-39.
- 8- Emala CW, Schwindinger WF, Wand GS, et al. Signal-transducing G proteins: basic and clinical implications. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1994; 47:81-111.

- 9- Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med*, 1999; 340:1012-20.
- 10- Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol*. 2006; 147:546-55.
- 11- Bezerra MGT, Latronico AC, Fragoso MCBV. Tumores endócrinos associados às mutações das proteínas Gs α e $G_i \alpha 2$. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2005; 49:784-90.
- 12- McCuden CR, Hains MD, Kimple RJ, et al. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*, 2005; 62:551-7.
- 13- Hauache, Omar M. Receptores acoplados à proteína G: implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2001; 45(3): 228-39.
- 14- Siffert W, Rosskopf D, Siffert G, et al. Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension. *Nat Genet*, 1998; 18:45-48.
- 15- Adam V, Benjafield, Cheryl L. et al. G-Protein $\beta 3$ Subunit Gene (GNB3) Variant in Causation of Essential Hypertension. *Hypertension*, 1998; 32:1094-97.
- 16- Meirhaeghe A, Bauters C, Helbecque N, et al. The human G-protein $\beta 3$ subunit C825T polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *Eur Heart J*, 2001; 22(10): 845-8.
- 17- Li M, Zhang B1, Li C1, et al. G-protein $\beta 3$ subunit polymorphisms and essential hypertension: a case-control association study in northern Han Chinese. *J Geriatr Cardiol*, 2015; 12:127-34.
- 18- Zheng H, Xu H, Cui B, et al. Association between polymorphism of the G-protein $\beta 3$ subunit C825T and essential hypertension: an updated meta-analysis involving 36,802 subjects. *Biol Res*, 2013; 46:265-73.
- 19- Mei Li, Bei Zhang, Chuang Li, Jie-Lin Liu, Li-Juan Wang, Ya Liu, Zuo-Guang Wang, and Shao-Jun Wen. G-protein $\beta 3$ subunit polymorphisms and essential hypertension: a case-control association study in northern Han Chinese. *J Geriatr Cardiol*, 2015 Mar; 12(2): 127-34.

945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003

20- El Din Hemimi NS, Mansour AA, Abdelsalam MM. Prediction of the Risk for Essential Hypertension among Carriers of C825T Genetic Polymorphism of G Protein $\beta 3$ (GNB3) Gene. *Biomark Insights*, 2016; 11:69-75.

21- Ko KD, Kim KK, Suh HS, et al. Associations between the GNB3 C825T polymorphism and obesity-related metabolic risk factors in Korean obese women. *J Endocrinol Invest*, 2014; 37(11):1117-20.

22- Fang L, Zhou C, Bai S, et al. The C825T polymorphism of the G-protein $\beta 3$ gene as a risk factor for depression: a meta-analysis. *PLoS One*, 2015; 10(7): e 0132274.

23- Semplicini A, Grandi T, Sandonà C, et al. G-protein $\beta 3$ -subunit gene C825T polymorphism and cardiovascular risk: an updated review. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 2015; 22(3):225-32.

24- Brand E, Herrmann SM, Nicaud V, et al. The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit, $\beta 3$ is not related to hypertension. *Hypertension*, 1999; 33:1175-1178.

25- Kato N, Sugiyama T, Morna H, et al. G protein $\beta 3$ subunit variant and essential hypertension in Japanese. *Hypertension*, 1998; 32:935-938.

26- Guo L, Zhang LL, Zheng B, et al. The C825T polymorphism of the G-protein $\beta 3$ subunit gene and its association with hypertension and stroke: an updated meta-analysis. *Plos One*, 2013; 8(6).

27- 2003 European society of Hypertension-European society of cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens*, 2003; 21:1011-1053.

28- National Institute of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute North American Association for the Study of Obesity. The Practical Guide: Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. *NHLBI Obesity Education Initiative, NIH Publication Number: 00-4084*, 2000.

29- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 2003; 26: 3160-67.

1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062

30- 2016 European Guidelines on Cardiovascular disease prevention in clinical practice. European Heart Journal, 2016; 37(29):2315-81.

31 - Hegele RA, Harris SB, Hanley Ai, et al. G protein $\beta 3$ subunit gene variant and blood pressure variation in Canadian Oji-Cree. Hypertension, 1998; 32: 688-92.

32- Schunkert H, Hense HW, Doring A, et al. Association between a polymorphism in the G protein $\beta 3$ subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. Hypertension, 1998; 32: 510-13.

33- Hayakawa T, Takamura T, Abe T, et al. Association of the C825T polymorphism of G-protein beta 3 subunit gene with hypertension, obesity, hyperlipidemia, insulin resistance, diabetes, diabetic complications, and diabetic therapies among Japanese. Metabolism, 2007; 56(1):44-8.

34- Schiffrin EL. Intracellular signal transduction for vasoactive peptides in hypertension. Can J Physiol Pharmacol, 1994, 72:954-62.

35- Baumgart D, Naber C, Haude M, et al. G protein $\beta 3$ - subunit 825 allele and enhanced coronary vasoconstriction on $\alpha 2$ -adrenoceptor activation. Circ Res, 1999; 85:965-9.

36- Kannel WB, Brand N, Skinner Jr. JJ, et al. The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension. The Framingham study. Ann Intern Med, 1967; 67: 48-59.

37- Johnson AL, Cornoni JC, Cassel JC, et al. Influence of race, sex and weight on blood pressure behavior in young adults. Am J Cardiol, 1975; 35: 523-30.

38- Mikhail N, Golub MS, Tuck ML. Obesity and hypertension. Prog Cardiovasc Dis, 1999; 42: 39-58.

39- Frohlich ED, Messerli FH, Reisin E, et al. The problem of obesity and hypertension. Hypertension, 1983; 5: (III): 71-8.

40- Siffert W, Forster P, Jöckel K-H, et al. Worldwide ethnic distribution of the G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasians, Chinese, and black African individuals. J Am Soc Nephrol, 1999; 10:1921-30.

- 41- Siffert W, Naber C, Walla M, et al. G protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its potential association with obesity in hypertensive individuals. *J Hypertens*, 1999; 17: 1095-1098.
- 42- Iiri T, Farfel Z, Bourne HR. G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature*, 1998; 394:35-8.
- 43- Hegele RA, Anderson C, Young TK, et al. G-protein $\beta 3$ subunit gene splice variant and body fat distribution in Nunavut Inuit. *Genome Res*, 1999; 9:972-7.
- 44- Gonçalves R, Freitas A, Branco M, et al. Y-chromosome Lineages from Portugal, Madeira and Açores Record Elements of Sephardim and Berber Ancestry. *Annals of Human Genetics*, 2005; 69: 443-54.
- 45- Brehm A, Pereira L, Kivisild T, et al. Mitochondrial portraits of the Madeira and Açores archipelagos witness different genetic pools of its settlers. *Hum Genet*, 2003; 114: 77-86.
- 46- Kati Kristiansson, Jussi Naukkarinen and Leena Peltonen. Isolated populations and complex disease gene identification. *Genome Biol*, 2008; 9:109.
- 47- Linn Jorde, Stephen P Wooding. Genetic variation, classification and race. *Nat Genet*, 2004; 36 (11 suppl):528-33.

Legendas

Figura 1: Discriminação genotípica do polimorfismo C825T do gene GN β 3 no Aparelho 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

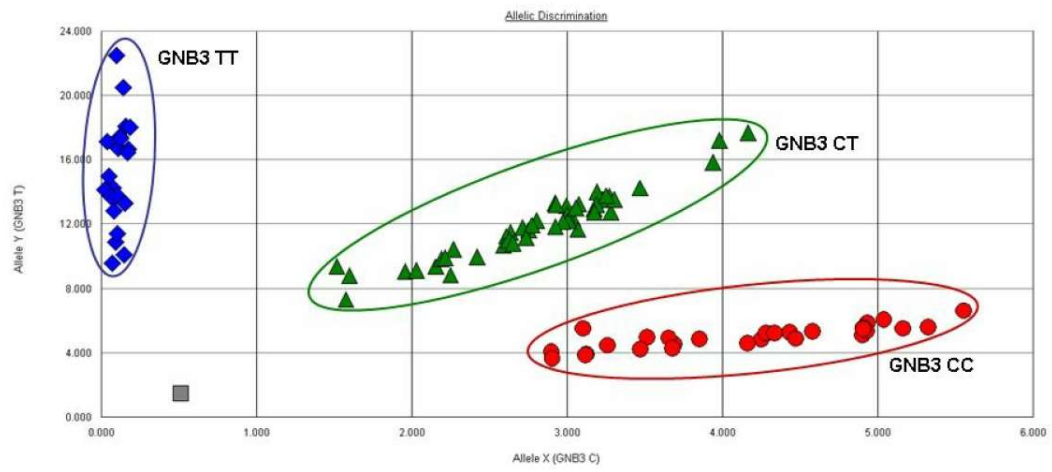


Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos participantes do estudo

Variáveis	Total (n=1641)	Hipertensos (n=848)	Controlos (n=793)	Valor p
Idade, anos	50,6±8,1	50,8±8,1	50,3±8,2	0,212
Sexo masculino, n (%)	819 (49,9)	439 (51,8)	380 (47,9)	0,119
Sedentarismo, n (%)	887 (54,1)	476 (56,1)	411 (51,8)	0,080
Álcool, n (%)	627 (38,2)	350 (41,3)	277 (34,9)	0,008
Tabagismo, n (%)	375 (22,9)	164 (19,3)	211 (26,6)	<0,0001
IMC, kg/m ²	27,7±4,9	29,2±5,2	26,2±4,	<0,0001
Obesidade, n (%)	441 (26,9)	326 (38,4)	115 (14,5)	<0,0001
Diabetes, n (%)	169 (10,3)	134 (15,8)	35 (4,4)	<0,0001
Dislipidemia, n (%)	815 (49,7)	470 (55,4)	345 (43,5)	<0,0001
PAS, mmHg	134,4±20,4	147,2±18,9	120,7±10,9	<0,0001
PAD, mmHg	84,5±12,1	91,1±11,7	77,4±7,7	<0,0001
Frequência cardíaca (bat./min.)	72,1±11,8	73,1±12,2	71,0±11,2	<0,0001

IMC – índice de massa corporal; PAD – Pressão Arterial Diastólica; PAS – Pressão Arterial Sistólica; Significância estatística para $p<0,05$.

Tabela 2: Características bioquímicas dos participantes do estudo

Variáveis	Total (n=1641)	Hipertensos (n=848)	Controlos (n=793)	Valor p
Hemoglobina, g/dl	14,3 (9,6-18,2)	14,4 (9,6-18,2)	14,2 (10,1-17,6)	<0,000 1
Plaquetas, 10 ³ /µl	229,0 (23-664)	233,0 (23-664)	227,0 (65-544)	0,206
Leucócitos, 10 ³ /µl	6,4 (2,1-18)	6,6 (2,9-18)	6,2 (2,1-16,6)	<0,000 1
Fibrinogénio, mg/dl	362 (179,2-874)	371,0 (179,2-874)	355,3 (224-688)	<0,000 1
Glicose, mg/dl	95 (66-364)	98,0 (70-360)	93,0 (66-364)	<0,000 1
Lipoproteína (a), mg/dl	16,3 (0,6-236)	16,6 (0,6-236)	16,2 (0,8-198,2)	0,730
Colesterol, mg/dl	207 (107-370)	208,5 (115-344)	206 (107-370)	0,193
HDL-C, mg/dl	48 (17,2-111,7)	46,9 (17,2-103)	49 (20,8-111,7)	<0,000 1
LDL-C, mg/dl	131 (37,7-269)	131 (37,7-269)	131 (42-260)	0,944
Triglicéridos, mg/dl	110 (21-1098)	119,0 (29-1098)	99,0 (21-688)	<0,000 1
Apolipoproteína B, mg/dl	104 (3,9-232)	106,6 (5,1-205)	99,7 (3,9-232)	<0,000 1
PCR (as), mg/dl	0,2 (0-18,5)	0,2 (0-13,1)	0,2 (0-18,5)	<0,000

As variáveis bioquímicas são apresentadas pela mediana (mínimo - máximo); HDL-C - colesterol das lipoproteínas de alta densidade; LDL-C - Colesterol das lipoproteínas de baixa densidade; PCR (as) - Proteína C reactiva de alta sensibilidade; Significância estatística para $p < 0,05$.

Tabela 3: Frequências alélicas do polimorfismo genético C825T do gene GNβ3.

C825T	Total	%	Casos	%	Controlos	%	OR (IC 95%)	Valor p
C	1985	60,5%	1006	59,3%	979	61,7%	1,106 (0,962-1,273)	0,158
T	1297	39,5%	690	40,7%	607	38,3%		
Total	3282	100%	1696	100%	1586	100%		

IC – Intervalo de confiança; OR – Odds ratio; significância estatística para $p<0,05$.

Tabela 4: Genótipos do polimorfismo genético C825T do gene GNβ3 e risco de Hipertensão Arterial (Modelo aditivo).

Polimorfismo	Genótipo (Modelo aditivo)	Casos (n=848)	Controlos (n=793)	OR (IC 95%)	Valor p
GNβ3 C825T	CC	288 (34,0%)	314 (39,6%)	Referência	-----
	CT	430 (50,7%)	351 (44,3%)	1,336 (1,079 - 1,653)	0,008
	TT	130 (15,3%)	128 (16,1%)	1,107 (0,827 - 1,482)	0,494

OR - Odds ratio; IC - Intervalo de confiança; significância estatística para p<0,05.

Tabela 5: Genótipos do polimorfismo genético C825T do gene GNβ3 e risco de Hipertensão Arterial (Modelo dominante).

Polimorfismo	Genótipo (Modelo aditivo)	Casos (n=848)	Controlos (n=793)	OR (IC 95%)	Valor p
GNβ3 C825T	CC	288 (34,0%)	314 (39,6%)	Referência	-----
	CT + TT	560 (66,0%)	479 (40,4%)	1,275 (1,042 - 1,559)	0,018

IC – Intervalo de confiança; OR – Odds ratio; significância estatística para $p<0,05$.

Tabela 6: Análise de regressão logística* com o modelo genético dominante do polimorfismo GNβ3 e as variáveis de confundimento.

Variáveis	B	S.E.	Wald	df	OR (IC 95%)	Valor p
Diabetes	1,223	0,205	35,711	1	3,397 (2,275 – 5,074)	<0,0001
Obesidade	1,185	0,126	88,686	1	3,270 (2,555 – 4,184)	<0,0001
Álcool	0,243	0,109	5,010	1	1,276 (1,031 – 1,579)	0,025
Tabaco	-0,464	0,127	13,359	1	0,629 (0,490 – 0,806)	<0,0001
GNβ3 (CT+TT)	0,236	0,108	4,755	1	1,267 (1,024 – 1,566)	0,029
Constante	-0,477	0,102	21,881	1	0,621	<0,0001

* Método Forward Wald (SPSS versão 19.0) - Saiu da equação o sedentarismo, sexo e idade; B – Beta coefficient; df – degrees of freedom; IC – Intervalo de Confiança; OR – Odds ratio; S.E. – Standard Error; significância estatística para p<0,05.