



REVISTA PORTUGUESA DE  
**HIPERTENSÃO**  
E RISCO CARDIOVASCULAR

15º CONGRESSO PORTUGUÊS DE  
**HIPERTENSÃO**  
E RISCO CARDIOVASCULAR GLOBAL

INTERNATIONAL MEETING ON HYPERTENSION  
AND GLOBAL CARDIOVASCULAR RISK

NOVAS  
DATAS

25 26 27 28

Fevereiro 2021  
Centro de Congressos  
VILAMOURA

SAVE THE DATE

[www.sphpta.org.pt](http://www.sphpta.org.pt)

Secretariado Executivo: VERANATURA  
Rua Augusto Macedo, 12 D, Esc. 2/3 - 1600-794 Lisboa  
Tel: 217 120 778 179 [cidallampacheco@veranatura.pt](mailto:cidallampacheco@veranatura.pt)

SOCIEDADE  
PORTUGUESA DE  
HIPERTENSÃO  
Portuguese Society of Hypertension

# POLIMORFISMOS GENÉTICOS E A SUA INTERAÇÃO NA SUSCETIBILIDADE PARA A HIPERTENSÃO NA POPULAÇÃO PORTUGUESA

## GENETIC POLYMORPHISMS AND THEIR INTERACTION IN SUSCEPTIBILITY TO HYPERTENSION IN THE PORTUGUESE POPULATION

Laura Aguiar<sup>1,2,3</sup> (Grau Académico – Mestre), Ildegário Semente<sup>1,2,4</sup> (Grau Académico – Mestre), Joana Ferreira<sup>1,2,3</sup> (Grau Académico – Licenciado), Andreia Matos<sup>1,2,3</sup> (Grau Académico – Mestre), Mário Rui Mascarenhas<sup>3,5</sup> (Grau Académico – Doutor), Luiz Menezes Falcão<sup>6</sup> (Grau Académico – Doutor), Paula Faustino<sup>3,4</sup> (Grau Académico – Doutor), Manuel Bicho<sup>1,2,3</sup> (Grau Académico – Doutor), Ângela Inácio<sup>1,2,3</sup> (Grau Académico – Doutor)

<sup>1</sup>Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral, Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>Laboratório de Genética, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>3</sup>Instituto de Saúde Ambiental, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>4</sup>Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

<sup>5</sup>Clínica de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>6</sup>Departamento de Medicina Interna, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

E-mail de correspondência do primeiro autor: [laurasoaresaguiar@gmail.com](mailto:laurasoaresaguiar@gmail.com)

### Resumo

**Introdução:** A Hipertensão Arterial (HTA) é um fator de risco cardiovascular muito prevalente em Portugal. Esta patologia é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais.

**Objetivo:** Este estudo teve como objetivo investigar a potencial implicação de polimorfismos genéticos nos genes eNOS e ECA e da sua interação na suscetibilidade para a HTA na população portuguesa.

**Métodos:** Foi realizado um estudo de caso-controlo para uma amostra de 377 indivíduos portugueses, dos quais 243 hipertensos (90 hipertensos ligeiros e 153 hipertensos graves) e 134 normotensos. As análises polimórficas do VNTR no intrão 4 do gene eNOS e do polimorfismo ECA inserção/deleção (I/D) foram realizadas por reação em cadeia da polimerase (PCR).

**Resultados:** Encontrou-se uma associação entre o alelo 4a do gene eNOS e a hipertensão ( $p=0,001$ ), sendo mais forte para a hipertensão grave ( $p<0,001$ ). Em relação ao gene ECA, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre doentes e controlos. No entanto, ao analisar os 2 polimorfismos em epistasia, encontrou-se uma tendência para associação entre a combinação do alelo 4a do gene eNOS e do alelo D do gene ECA e a hipertensão ligeira ( $p=0,061$ ).

**Conclusão:** Os nossos resultados evidenciam o contributo do gene eNOS na HTA, assim como da interação epistática entre os genes eNOS e ECA e a suscetibilidade para a hipertensão ligeira na população portuguesa. A identificação de polimorfismos genéticos que possam influenciar o desenvolvimento e gravidade da HTA, bem como as suas interações epistáticas, pode permitir um diagnóstico mais precoce e específico para esta doença tão prevalente em Portugal.

### Abstract

**Introduction:** Arterial hypertension (AHT) is a highly prevalent cardiovascular risk factor in Portugal. This pathology is multifactorial, involving genetic and environmental factors.

**Objective:** This study aimed to investigate the potential implication of genetic polymorphisms in eNOS and ACE genes and their interaction in the susceptibility to hypertension in the portuguese population.

**Methods:** A case-control study was conducted in a sample of 377 Portuguese individuals, 243 hypertensives (90 mild hypertensive patients and 153 severe hypertensive patients) and 134 normotensives. The polymorphic analyses of intron 4 VNTR in the eNOS gene and the insertion/deletion (I/D) in ACE gene were performed by polymerase chain reaction (PCR).

**Results:** An association between the 4a allele of eNOS and hypertension was found ( $p=0.001$ ), being stronger for severe hypertension ( $p<0.001$ ). ACE shows no statistically significant differences between patients and controls. However, when tested the epistatic interaction between the two polymorphisms, a tendency for association was found between mild hypertension and the combination of the 4a allele (eNOS) with the D allele of ACE ( $p=0.061$ ).

**Conclusion:** Our results highlight the contribution of the eNOS gene in AHT and the epistatic interaction between eNOS and ACE genes to the susceptibility for mild hypertension in the Portuguese population. The identification of genetic polymorphisms that may influence the development and severity of hypertension, as well as their epistatic interactions, may allow a more early and specific diagnosis for this disease, so prevalent in Portugal.



## Introdução

A hipertensão arterial (HTA) é reconhecida como um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo muito prevalente em Portugal (1, 2). Esta patologia é multifatorial uma vez que resulta da interação de vários fatores ambientais e genéticos que atuam aumentando a pressão arterial (3, 4). A função endotelial está intimamente associada à regulação da pressão arterial (5, 6). A enzima sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), que sintetiza óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina, é um dos principais determinantes da função endotelial (7, 8), sugerindo que polimorfismos no gene *eNOS* possam influenciar a suscetibilidade para a hipertensão.

Da mesma forma, a enzima conversora da angiotensina (ECA), que faz parte do sistema renina-angiotensina, desempenha um papel central na regulação da pressão arterial, por catalisar a conversão de angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor, que estimula a reabsorção de sódio no rim (9, 10). A produção constante de angiotensina II pode resultar na remodelação e reestruturação de vários componentes do sistema cardiovascular (11). Assim, polimorfismos genéticos no gene *ECA* podem estar implicados na patogénese da hipertensão arterial.

Neste contexto, investigámos a potencial implicação de polimorfismos genéticos nos genes *eNOS* e *ECA* e da sua interação, no desenvolvimento da HTA na população portuguesa.

## Materiais e Métodos

### Amostra populacional

Foi realizado um estudo de caso-controlo para uma amostra de 377 indivíduos portugueses entre os 19 e os 98 anos, sendo 243

hipertensos (150 do sexo feminino e 93 do sexo masculino), dos quais 90 hipertensos ligeiros e 153 hipertensos graves, e 134 normotensos (84 do sexo feminino e 50 do sexo masculino). As amostras dos controlos e dos hipertensos ligeiros foram recolhidas na Clínica de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo de Lisboa. As amostras dos hipertensos graves, com insuficiência cardíaca, foram recolhidos no Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte.

### Genotipagem

As análises polimórficas do número variável de repetições em tandem (VNTR) no intrão 4 (repetição em tandem de 27 pb) do gene *eNOS* e do polimorfismo *ECA* I/D (inserção/ deleção) foram realizadas por reação em cadeia da polimerase (PCR).

### Análise estatística

As diferenças entre os grupos estudados foram analisadas recorrendo ao teste do  $\chi^2$  de Pearson ou teste exato de Fisher. Todas as análises estatísticas foram realizadas recorrendo ao software SPSS, versão 24.0, sendo o nível de significância estatística estabelecido para  $p < 0,05$ .

## Resultados

Quando os polimorfismos foram analisados isoladamente, encontrou-se uma associação entre o alelo 4a do gene *eNOS* e a hipertensão ( $p=0,001$ ) (Tabela 1). O valor de significância aumentou ao selecionarmos apenas os casos de hipertensão grave ( $p<0,001$ ) (Tabela 2). Em relação ao gene *ECA*, não se encontram diferenças estatisticamente significativas entre doentes e controlos (Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3). No entanto,

**Tabela 1 – Comparações entre normotensos e hipertensos de genótipos nos genes *eNOS* e *ECA* e a sua interação**

Gene	Genótipo	Normotensos	Hipertensos	Valor p
<i>eNOS</i>	Presença do alelo 4a	34 (26,4)	102 (44,3)	0,001 <sup>1</sup>
	Ausência do alelo 4a	95 (73,6)	128 (55,7)	
<i>ECA</i>	Presença do alelo D	71 (93,4)	84 (89,4)	0,354 <sup>1</sup>
	Ausência do alelo D	5 (6,6)	10 (10,6)	
<i>ECA</i> + <i>eNOS</i>	Presença do alelo 4a e do alelo D	19 (25,3)	27 (32,1)	0,345 <sup>1</sup>
	Outras combinações	56 (74,7)	57 (67,9)	

<sup>1</sup> $\chi^2$  de Pearson – n (%)

**Tabela 2 – Comparações entre normotensos e hipertensos graves de genótipos nos genes *eNOS* e *ECA* e a sua interação**

Gene	Genótipo	Normotensos	Hipertensos graves	Valor p
<i>eNOS</i>	Presença do alelo 4a	34 (26,4)	73 (47,7)	<0,001 <sup>1</sup>
	Ausência do alelo 4a	95 (73,6)	80 (52,3)	
<i>ECA</i>	Presença do alelo D	71 (93,4)	30 (90,9)	0,696 <sup>2</sup>
	Ausência do alelo D	5 (6,6)	3 (9,1)	
<i>ECA</i> + <i>eNOS</i>	Presença do alelo 4a e do alelo D	19 (25,3)	6 (18,2)	0,417 <sup>1</sup>
	Outras combinações	56 (74,7)	27 (81,8)	

<sup>1</sup> $\chi^2$  de Pearson – n (%)

<sup>2</sup>Teste exato de Fisher – n (%)

para a combinação entre o alelo 4a do gene *eNOS* e do alelo D do gene *ECA* encontrou-se uma tendência para associação com a hipertensão ligeira (p=0,061) (Tabela 3).

### Discussão

Estando a enzima eNOS envolvida na função endotelial, vários estudos exploraram a associação entre polimorfismos no gene *eNOS* e a suscetibilidade para doenças cardiovasculares e hipertensão (12–19). Um dos principais polimorfismos estudados neste gene é o VNTR no intrão 4 do gene *eNOS*. No presente estudo, este polimorfismo foi genotipado em hipertensos, ligeiros e graves, e controlos de modo a estudar a sua associação com a HTA na população portuguesa. Assim, encontrou-se uma associação entre o alelo 4a (quatro cópias de repetições de 27 pb) e a hipertensão, sendo esta associação mais forte na hipertensão grave. Este alelo está associado a níveis mais baixos de NO uma vez que há diminuição da expressão de eNOS (20, 21). A diminuição de níveis de NO pode levar à perda de integridade do endotélio que pode conferir suscetibilidade para a hipertensão (6–8). Associações entre o alelo 4a e a doença arterial coronária foram estabelecidas (12, 13). Na hipertensão, também existem estudos que associaram este alelo isoladamente ou em haplótipo à doença (14–18).

Após a implicação do sistema renina-angiotensina na patogénese de doenças cardiovasculares e hipertensão, estudos de associação exploraram a relação entre variantes genéticas dentro deste sistema e o risco para estas patologias (22–30). Um dos polimorfismos mais estudados neste sistema é o *ECA* I/D, que no presente trabalho foi

estudado na população portuguesa normotensa e hipertensa ligeira e grave, não se encontrando diferenças estatisticamente significativas. Existem resultados de outros estudos que estão concordantes com os nossos, não se encontrando diferenças estatisticamente significativas entre doentes e controlos (25, 27). No entanto, também existem vários estudos que associam o alelo D à hipertensão (24, 28–30). De facto, o alelo D está relacionado com uma maior atividade da enzima ECA (31). Neste estudo, quando foi feita a interação entre os polimorfismos nos genes *eNOS* e *ECA*, encontrou-se uma tendência para associação entre a interação dos alelos 4a do gene *eNOS* e D do gene *ECA* e a hipertensão ligeira, sugerindo que este alelo por si não se associa à HTA mas em interação com outros, nomeadamente o alelo 4a do VNTR do intrão 4 do gene *eNOS*, poderá conferir alguma suscetibilidade para a HTA ligeira. Ainda outros genes relacionados com o metabolismo do NO (32, 33), como *CYB5R3* e *G6PD*, bem como genes que fazem parte do sistema renina-angiotensina (34, 35), como *AGT* e *AGTR1*, também poderão estar associados com a suscetibilidade para a HTA.

Os nossos resultados mostram uma associação entre o gene *eNOS* e a HTA na população portuguesa. Os resultados sugerem ainda uma relação entre a interação epistática nos genes *eNOS* e *ECA* e a suscetibilidade para o desenvolvimento de hipertensão ligeira. A identificação de polimorfismos genéticos que possam influenciar o desenvolvimento e gravidade da HTA, bem como as suas interações epistáticas, pode permitir um diagnóstico mais precoce e específico, que pode proporcionar melhores estratégias terapêuticas e de prevenção, para esta doença tão prevalente em Portugal.



**Tabela 3 – Comparações entre normotensos e hipertensos ligeiros de genótipos nos genes *eNOS* e *ECA* e a sua interação**

Gene	Genótipo	Normoten sos	Hiperten sos ligeiros	Valor P
<i>eNOS</i>	Presença do alelo 4a	34 (26,4)	29 (37,7)	0,088 <sup>1</sup>
	Ausência do alelo 4a	95 (73,6)	48 (62,3)	
<i>ECA</i>	Presença do alelo D	71 (93,4)	54 (88,5)	0,314 <sup>1</sup>
	Ausência do alelo D	5 (6,6)	7 (11,5)	
<i>ECA+ eNOS</i>	Presença do alelo 4a e do alelo D	19 (25,3)	21 (41,2)	0,061 <sup>1</sup>
	Outras combinações	56 (74,7)	30 (58,8)	

<sup>1</sup> $\chi^2$  de Pearson – n (%)

#### Bibliografia

- Polonia J, Martins L, Pinto F, and Nazare J. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: changes over a decade. *The PHYSA study*. *J Hypertens* 2014; 32:1211–1221.
- Rodrigues AP, Gaio V, Kislaya I, Graff-Iversen S, Cordeiro E, Silva AC, et al. Prevalência de hipertensão arterial em Portugal: resultados do Primeiro Inquérito Nacional com Exame Físico (INSEF 2015). *Bol Epidemiológico Obs* 2017; 6:11–14.
- 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; 41:677–687.
- Fan W, Qu X, Li J, Wang X, Bai Y, Cao Q, et al. Associations between polymorphisms of the ADIPOQ gene and hypertension risk: a systematic and meta-analysis. *Sci Rep* 2017; 7:41683.
- Gokce N, Holbrook M, Duffy SJ, Demissie S, Cupples LA, Biegelsen E, et al. Effects of race and hypertension on flow-mediated and nitroglycerin-mediated dilation of the brachial artery. *Hypertension* 2001; 38:1349–1354.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush Jr JE, and Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323:22–27.
- Forstermann U and Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006; 113:1708–1714.
- Gewaltig MT and Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 2002; 55:250–260.
- Bae Y, Park C, Han J, Hong YJ, Song HH, Shin ES, et al. Interaction between GNB3 C825T and ACE I/D polymorphisms in essential hypertension in Koreans. *J Hum Hypertens* 2007; 21:159–166.
- Matsubara M, Suzuki M, Fujiwara T, Kikuya M, Metoki H,

Michimata M, et al. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and hypertension: the Ohasama study. *J Hypertens* 2002; 20:1121–1126.

- Weir MR and Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens* 1999; 12:2058–2138.
- Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCreddie RM, and Wilcken DEL. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996; 2:41–45.
- Matyar S, Attila G, Acartürk E, Akpınar O, and İnal T. *eNOS* gene intron 4 a/b VNTR polymorphism is a risk factor for coronary artery disease in Southern Turkey. *Clin Chim acta* 2005; 354:153–158.
- Shankarishan P, Borah PK, Ahmed G, and Mahanta J. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of hypertension in an Indian population. *Biomed Res Int* 2014; 2014:793040.
- Uwabo J, Soma M, Nakayama T, and Kanmatsuse K. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *Am J Hypertens* 1998; 11:125–128.
- Patkar S, Charita BH, Ramesh C, and Padma T. High risk of essential hypertension in males with intron 4 VNTR polymorphism of *eNOS* gene. *Indian J Hum Genet* 2009; 15:49–53.
- Nejatizadeh A, Kumar R, Stobdan T, Goyal AK, Sikdar S, Gupta M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes and circulating nitric oxide levels significantly associate with risk of essential hypertension. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:1912–1918.
- Chen Q, Wang H, Xiao D, Liang T, Yu J, and Yang J. Association between *eNOS* 4b/a polymorphism and susceptibility of pulmonary hypertension: a meta-analysis of 6 studies. *Int J Clin Exp Med* 2016;

9:15510–15517.

19. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32:3–8.

20. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245:190–193.

21. Song J, Yoon Y, Park KU, Park J, Hong YJ, Hong SH, et al. Genotype-specific influence on nitric oxide synthase gene expression, protein concentrations, and enzyme activity in cultured human endothelial cells. *Clin Chem* 2003; 49:847–852.

22. Sethi AA, Nordestgaard BG, and Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1269–1275.

23. Hindorff LA, Heckbert SR, Tracy R, Tang Z, Psaty BM, Edwards KL, et al. Angiotensin II type 1 receptor polymorphisms in the cardiovascular health study: relation to blood pressure, ethnicity, and cardiovascular events. *Am J Hypertens* 2002; 15:1050–1056.

24. Barbalić M, karić-Jurić T, Cambien F, Barbaux S, Poirier O, Turek S, et al. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system and early development of hypertension. *Am J Hypertens* 2006; 19:837–842.

25. Tiret L, Blanc H, Ruidavets J-B, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, et al. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. *J Hypertens* 1998; 16:37–44.

26. Morris BJ, Zee RY, and Schrader AP. Different frequencies of angiotensin-converting enzyme genotypes in older hypertensive individuals. *J Clin Invest* 1994; 94:1085–1089.

27. Almada BVP, Braun V, Nassur BA, Ferreira TS, Paula F, and

Morelato RL. Associação da hipertensão arterial com polimorfismo da enzima conversora da angiotensina em indivíduos idosos. *Rev Bras Clin Médica* 2010; 8:320–322.

28. Wilson AC, Abbud ZA, and Kostis JB. Association of DD genotype of angiotensin converting enzyme with hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1996; 2:52A.

29. Abraham WT, Raynolds M V, Badesch DB, Wynne KM, Groves BM, Roden RL, et al. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with primary pulmonary hypertension: increased frequency and association with preserved haemodynamics. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2003; 4:27–30.

30. Freitas SRS, Cabello PH, Moura-Neto RS, Dolinsky LC, and Bóia MN. Análise combinada de fatores genéticos e ambientais na hipertensão essencial em um município da região Amazônica. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88:447–451.

31. Chiang F-T, Lai Z-P, Chern T-H, Tseng C-D, Hsu K-L, Lo H-M, et al. Lack of association of the angiotensin converting enzyme gene polymorphism with essential hypertension in a Chinese population. *Am J Hypertens* 1997; 10:197–201.

32. Straub AC, Lohman AW, Billaud M, Johnstone SR, Dwyer ST, Lee MY, et al. Endothelial cell expression of haemoglobin  $\alpha$  regulates nitric oxide signalling. *Nature* 2012; 491:473–477.

33. Gaskin RS, Estwick D, and Peddi R. G6PD deficiency: its role in the high prevalence of hypertension and diabetes mellitus. *Ethn Dis* 2001; 11:749–754.

34. Kim H-K, Lee H, Kwon J-T, and Kim H-J. A polymorphism in AGT and AGTR1 gene is associated with lead-related high blood pressure. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2015; 16:712–719.

35. Chung WK, Deng L, Carroll JS, Mallory N, Diamond B, Rosenzweig EB, et al. Polymorphism in the angiotensin II type 1 receptor (AGTR1) is associated with age at diagnosis in pulmonary arterial hypertension. *J Hear Lung Transplant* 2009; 28:373–379.