Lilian Kimura

Fatores genéticos associados à hipertensão
essencial em populações remanescentes de
quilombos do Vale do Ribeira - São Paulo

São Paulo

2010

Lilian Kimura

Fatores genéticos associados à hipertensão
essencial em populações remanescentes de
quilombos do Vale do Ribeira - São Paulo

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de
Título de Doutor em Ciências, na
Área de Biologia/Genética

Orientador(a): Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto

São Paulo

2010

Dados catalográficos

Kimura, Lilian

Fatores genéticos associados à hipertensão essencial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira – São Paulo

166 páginas

Tese Doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1.Genética da hipertensão 2.Estudos de associação
3.Remanescentes de quilombos 4.Afro-descendentes

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).
Profa. Dra. Regina Célia Mingroni Netto
Orientador(a)

*Ao meu querido Israel Rubio,
por tornar a minha vida mais
completa.*

"O Amor...

É difícil para os indecisos.

É assustador para os medrosos.

Avassalador para os apaixonados!

Mas, os vencedores no amor são os fortes.

Os que sabem o que querem e querem o que têm!

Sonhar um sonho a dois,

e nunca desistir da busca de ser feliz,

é para poucos!!"

Cecília Meireles

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Regina Célia Mingroni Netto, não somente pela orientação deste trabalho, mas também pelos cuidados de mãe que muitas vezes deixou transparecer nessa convivência de sete anos.

Ao Dr. Tiago V. Pereira, pela extrema paciência, por todos os esclarecimentos conceituais, por todo o suporte na realização e interpretação das análises estatísticas.

Ao amigo Gustavo Ribeiro por me socorrer com seus conhecimentos estatísticos, por ser tão prestativo e por ter tido extrema paciência ao me auxiliar na interpretação dos resultados na conclusão da tese.

Aos meus amigos “quilombolas” Daniel Rincon e Claudia B. Angeli, por todo o empenho no projeto dos quilombos, auxílio extra e pelas risadas nas longas viagens ao Vale do Ribeira, tornando cada expedição um acontecimento.

Aos demais “quilombolas” Nelson H. Cotrim e Lúcia Inês M. de Souza, pelo empenho nas viagens e na construção das genealogias.

Agradeço à minha amiga Maria Teresa B. de M. Auricchio, pelos conselhos, pelo apoio técnico e por todos os momentos de descontração tanto nas viagens como no laboratório.

Meus agradecimentos à minha amiga Eliete Pardono, tanto pela dedicação e carinho remetidos ao trabalho nos quilombos, como por ser uma pessoa especial.

Agradeço também aos “quilombolas eventuais” Karina L. Mandelbaum, Deborah A. Nogueira, Fernando J. Velloso, Rafaella M. P. Nascimento e Renata T. S. de Aguiar, pela participação voluntária (mas com grande dedicação) nas viagens.

Aos médicos da nossa equipe, Dr. João Pedro Vicente e Roberto Maluf pelo exame clínico dos indivíduos quilombolas, e especialmente ao amigo Franklin Albert S. Kono (em memória), pela amizade, dedicação e por ter tornado nossas viagens uma troca de experiências.

Aos Drs. José Eduardo Krieger e Alexandre Pereira, do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, pelo incentivo na elaboração do projeto, e especialmente ao Dr. Alexandre pelas valiosas sugestões de análises.

Ao Dr. Sidney E. Batista dos Santos e à doutoranda Elzemar M. Ribeiro Rodrigues, do Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA, por terem me recebido de forma acolhedora para realizar as genotipagens dos INDEL por duas vezes. Agradeço também aos demais membros do LGHM pelo interesse em me familiarizar com o ambiente.

Meus agradecimentos sinceros ao Prof. Dr. Paulo Alberto Otto pelos valiosos ensinamentos durante a minha trajetória acadêmica.

Às Profas. Dras. Angela M. Vianna Morgante e Luciana A. Haddad, pelo interesse constante nesse trabalho e pela disponibilidade em ajudar.

Ao Depto. de Genética e Biologia Evolutiva e ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela infra-estrutura que permitiu a realização desse projeto.

Aos motoristas do IBUSP, pela competência e alegria durante as viagens.

Aos funcionários e funcionárias das mais diversas seções do Instituto de Biociências, por serem sempre prestativos.

À Profa. Dra Mayana Zatz, coordenadora do CEPID (Centro de Estudos do Genoma Humano), cujo desenvolvimento e financiamento foram fundamentais à execução desse projeto.

Às técnicas do Centro de Estudos do Genoma Humano Kátia Rocha, Camila Juncansen e Martha Lima Cozzo, pelo auxílio técnico com as genotipagens automáticas.

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Agradeço à amiga Maraisa de C. Sebastião, que sempre foi muito prestativa e me deu todo o suporte necessário ao cuidar das “burocracias” do projeto.

Aos funcionários Paulo Rogério de Camargo, Maria Raimunda L. S. Pinheiro e Laurinda de Fátima P. C. Baptista por toda a atenção e suporte técnico.

À antiga geração do Lab 349, Ronaldo S. Abreu Silva, Karina Lezirovitz Mandelbaum, Ana Carla Batissoco e Jihane Romanos, pela amizade e por terem cuidado de mim logo que eu integrei essa equipe, especialmente à Ana Carla por ter sido minha paciente companheira em momentos de alegria e de estresse durante a minha trajetória no laboratório.

À nova geração do Lab 349, Renata Thiele, Renata Nonose, Daniela Tiaki, Dayane Cruz e Vitor Dantas. Meus agradecimentos especiais à Thiele e Tiaki por terem me ouvido pacientemente nos momentos de estresse, e à Dayane e à Rezinha, que além da mesma paciência, estiveram sempre comigo nos momentos de crise.

À minha segunda “mãe” Ligia Vieira, por ter me amparado tantas vezes, e por ter feito companhia nos momentos mais difíceis.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Humana e “adjacências”, dos quais sentirei saudades: Jacaré, Silvinha, Larissa, Ana Carolina, Adriano, José, Renan, Ana Maria, Joana, Érica, Raquel, Felipe, Marilena, Christiane, Andressa e Max, especialmente ao Jacaré por tantas vezes dividir as tarefas com as genotipagens, e à Marilena e ao Felipe pelo convite à viagem para Avanhandava, pois a companhia de vocês foi essencial para que eu mantivesse o foco.

À minha grande amiga Dayse Alencar (e sua família), por terem me acolhido em sua casa em Belém, pelos passeios “turísticos” de ônibus e pela companhia nos almoços na Edilena.

À minha sempre professora e amiga Vera Rita, por mostrar o “mundo fantástico” da Biologia.

Agradeço a minha sempre amiga Renata Gomes Nascimento, por doze anos de amizade e histórias.

Aos meus pais Edison e Eunice, por serem meus exemplos de vida, por sempre terem acreditado e investido no meu potencial, pelo incentivo e pelo amor incondicional. Agradeço também ao meu irmão Marcio, pelas conversas na madrugada, pelas risadas, pelo carinho que sempre teve comigo.

Agradeço à minha família, Tia Fátima, Tio Zinho, Amanda, Aline, Tia Junko, Tio Itiro (em memória), Lu, Mau, Pri, Bob, Bá e Ditian, por fazerem parte da minha vida.

Meus sinceros agradecimentos ao Israel, meu marido e grande amor da minha vida, por tudo o que já passamos juntos, pelo apoio em todos os momentos, pelo carinho e cuidados, por me incentivar a nunca parar de lutar e por nunca me deixar desistir de um sonho.

Agradeço a DEUS, que tudo permitiu nessa jornada pela busca de conhecimento.

À família STM e “agregados” (Meire, Tião, Aninha, Martins e Will), pela torcida e pelos cuidados, e por toda a alegria que dividimos.

À minha família quilombola Cida, Martelo, Dani, Alana, Flávio e Gabriel, por todos os bons momentos vividos, por terem nos recebido com tanta generosidade em sua casa e por todas as histórias de pescaria na beira do rio.

Às prefeituras dos municípios de Eldorado, Iporanga e Barra do Turvo pelo apoio. Às irmãs Angela Biagioni e Maria Sueli Berlanga, da Casa Paroquial de Eldorado e a Antônio Carlos Nicomedes, do MOAB, pela ajuda no contato com as comunidades.

Aos indivíduos das comunidades quilombolas, especialmente aos líderes e agentes de saúde, pela colaboração, sem a qual não teríamos concretizado mais esse trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	1
<i>Abstract</i>	3
Capítulo 1	
1. Revisão bibliográfica	5
1.1. Epidemiologia da Hipertensão	5
1.2. Fisiologia da regulação da pressão arterial	9
1.3. Genética da Hipertensão	11
1.3.1. Hipertensão monogênica	12
1.3.2. Hipertensão essencial	13
1.4. Estratégias para o estudo genético da hipertensão	13
1.4.1. Estudos de ligação	13
1.4.2. Estudos de associação	15
1.5. Genes candidatos selecionados para esse estudo	18
1.5.1. O gene <i>ACE</i>	19
1.5.2. O gene <i>AGT</i>	21
1.5.3. O gene <i>GNB3</i>	23
1.5.4. O gene <i>NOS3</i>	25
1.5.5. O gene <i>ADD2</i>	27
1.5.6. O gene <i>GRK4</i>	28
1.6. Os remanescentes de quilombos como modelo para estudo das bases genéticas da hipertensão essencial	30
Capítulo 2	
2. Objetivos	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
Capítulo 3	
3. Amostras e métodos	36
3.1. Amostras e localização das doze populações estudadas	36
3.2. Aspectos éticos	38
3.3. Histórico clínico	38
3.4. Medidas de pressão arterial	39
3.5. Medidas antropométricas	40

3.6. Extração de DNA genômico	40
3.7. Estudos moleculares	40
3.7.1. Estudo dos marcadores de ancestralidade do tipo INDEL	40
3.7.2. Estudo dos sete polimorfismos selecionados	45
a) Estudo do polimorfismo <i>ACE</i> I/D	46
b) Estudo dos polimorfismos <i>NOS3</i> Glu298Asp, <i>GNB3</i> C825T, <i>AGT</i> M235T, <i>ADD2</i> A/C e <i>GRK4</i> A486V	47
c) Estudo do polimorfismo <i>GNB3</i> A-350G	50
<hr/> Capítulo 4	
4. Estudo de ancestralidade nas populações remanescentes de quilombos	51
4.1. Introdução	51
4.2. Objetivo	55
4.3. Amostras e Métodos	56
4.4. Resultados	56
4.5. Discussão	60
4.6. Conclusões	63
<hr/> Capítulo 5	
5. Associação entre sete polimorfismos e a suscetibilidade à hipertensão essencial nas populações remanescentes de quilombos: estudo transversal	64
5.1. Introdução	64
5.2. Objetivos	66
5.3. Amostras e Métodos	66
5.3.1. Amostras e determinação dos genótipos	66
5.3.2. Caracterização clínica e antropométrica	67
5.3.3. Influência das variáveis clínicas e antropométricas sobre a pressão arterial e a Hipertensão	67
5.3.4. Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	68
5.3.5. Análise da presença de estratificação populacional	68
5.3.6. Estudos de associação	68
5.3.6.1. Definição dos grupos hipertensos e normotensos	68
5.3.6.2. Desenho	69
i) Avaliação dos efeitos individuais dos polimorfismos no risco de hipertensão essencial	69
ii) Avaliação dos efeitos individuais dos polimorfismos na variação da pressão arterial	70

iii) Avaliação de efeitos haplotípicos no risco de hipertensão essencial e na variação da pressão arterial	70
iv) Avaliação dos efeitos multilocos	71
5.4. Resultados	72
5.5. Discussão	90
5.6. Conclusões	94

Capítulo 6

6. Associação entre sete polimorfismos e a suscetibilidade à hipertensão essencial nas

populações remanescentes de quilombos: estudo baseado em famílias	95
6.1. Introdução	95
6.2. Objetivos	97
6.3. Amostras e métodos	97
6.3.1. Amostras e determinação dos genótipos	97
6.3.2. Construção das genealogias	97
6.3.3. Desenho do estudo	98
6.3.3.1. Definição dos indivíduos hipertensos e normotensos	98
6.3.3.2. Estudo de associação baseado em famílias	98
6.3.3.3. Herdabilidade da pressão arterial	99
6.4. Resultados	100
6.5. Discussão	106
6.6. Conclusões	108

Referências	109
--------------------	------------

Anexo I	130
Anexo II	153
Anexo III	154
Anexo IV	155
Anexo V	156
Anexo VI	160

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Prevalências do diabetes tipo 2, hiperlipidemia e hipertensão de acordo com a ancestralidade em populações norte-americanas.	8
Figura 2.1: Taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares e suas diferentes causas no Brasil.	8
Figura 3.1: Sistema renina-angiotensina-aldosterona.	10
Figura 4.1: Mapas dos estados de São Paulo e Paraná. Em verde, localização geográfica do Vale do Ribeira. O quadrado azul corresponde à área onde se concentram as comunidades remanescentes de quilombos por nós estudadas.	32
Figura 5.1: Vista panorâmica do Vale do Ribeira na comunidade de Abobral.	33
Figura 6.1: Travessia por meio de balsa que dá acesso às comunidades de Pilões e Maria Rosa.	33
Figura 7.1: Detalhe da balsa que dá acesso à comunidade de Pedro Cubas e detalhe do caminho de acesso à comunidade de São Pedro, sem qualquer pavimentação.	34
Figura 8.1: Casas características das comunidades remanescentes de quilombos – comunidade de Reginaldo.	34
Figura 1.3: Localização das doze comunidades de remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira estudadas.	37
Figura 2.3: Exemplo de resultado gerado pelo <i>software</i> de análise do Genetic Analyser 3130.	45
Figura 3.3: Resultados da eletroforese dos produtos de PCR do gene <i>ACE</i> .	47
Figura 4.3: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP M235T no gene <i>AGT</i> , realizada com o <i>MegaBace SNUPe Genotyping Kit</i> .	48
Figura 5.3: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP Glu298Asp no gene <i>NOS3</i> , realizada com o <i>MegaBace SNUPe Genotyping Kit</i> .	48
Figura 6.3: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP C825T no gene <i>GNB3</i> , realizada com o <i>MegaBace SNUPe Genotyping Kit</i> .	48
Figura 7.3: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP A/C no gene <i>ADD2</i> , realizada com o <i>MegaBace SNUPe Genotyping Kit</i> .	49
Figura 8.3: Exemplo de resultado da genotipagem automática do SNP A486V no gene <i>GRK4</i> , realizada com o <i>MegaBace SNUPe Genotyping Kit</i> .	49
Figura 9.3: Exemplo de resultado da genotipagem do SNP G-350A no gene <i>GNB3</i> .	50
Figura 1.4: Representação ternária da distribuição dos indivíduos em relação à porcentagem estimada de contribuição genética de cada ancestralidade (africana, européia e ameríndia).	57
Figura 2.4: Representação gráfica das estimativas de ancestralidade individual das três subpopulações parentais e dos indivíduos dos remanescentes de quilombo.	57

Figura 3.4: Distâncias genéticas em duas dimensões entre as 10 populações estudadas, baseadas nos valores de F_{st} , obtidas por escalonamento multidimensional.	59
Figura 1.5: Distribuição do grau de atividade física (GAF) em homens e mulheres.	73
Figura 2.5: Frequência da hipertensão essencial em homens e mulheres dos remanescentes de quilombos, considerando os dois fenótipos da hipertensão.	74
Figura 3.5: Frequência da hipertensão em cada população, considerando todos os indivíduos.	75
Figura 4.5: Frequência da hipertensão em homens e mulheres em cada faixa etária, no total das doze populações remanescentes de quilombos.	76
Figura 5.5: Gráficos mostrando o intervalo interquartil referente às estimativas de ancestralidade africana, européia e ameríndia, entre os normotensos e hipertensos genotipados em relação ao painel de INDEL.	81
Figura 1.6: Exemplo de genealogia informatizada por meio do programa GenoPro2007 ®, versão 2.0.	100

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1: Classificação da pressão arterial segundo as medidas obtidas em consultório.	5
Tabela II.1: Relação de síndromes genéticas humanas descritas até o momento em que a hipertensão é o principal sinal clínico.	12
Tabela III.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene <i>ACE</i> .	20
Tabela IV.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene <i>AGT</i> .	22
Tabela V.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene <i>GNB3</i> .	24
Tabela VI.1: Estudos de associação com polimorfismos no gene <i>NOS3</i> .	26
Tabela VII.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene <i>ADD2</i> .	28
Tabela VIII.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene <i>GRK4</i> .	29
Tabela I.3: Número estimado do total de habitantes de cada comunidade, número estimado de habitantes com idade igual ou superior a 17 anos, número de indivíduos estudados e porcentagem de cobertura do estudo.	38
Tabela II.3: Valor de GAF atribuído ao indivíduo de acordo com as atividades físicas exercidas diariamente.	39
Tabela III.3: Sequências dos <i>primers</i> utilizados na genotipagem do painel de 48 indels, tamanho dos fragmentos amplificados, tamanho dos alelos, concentração utilizada no protocolo de amplificação, fluorocromo dos <i>primers</i> marcados, localização e posição cromossômica.	42
Tabela IV.3: Polimorfismos estudados, localização no gene, região cromossômica no qual o gene está localizado, alelos de cada polimorfismo e sequências de <i>primers</i> .	46
Tabela I.4: Porcentagens da contribuição genética média das três subpopulações (africana, europeia e ameríndia) na composição dos remanescentes de quilombos.	58
Tabela II.4: Matriz triangular inferior de distâncias genéticas (<i>Fst</i>) entre todos os pares possíveis das populações, em relação ao painel de 48 marcadores INDEL.	59
Tabela I.5: Genes candidatos selecionados e vias de atuação na regulação da pressão arterial.	67
Tabela II.5: Dados demográficos e antropométricos na amostra de 759 indivíduos do Vale do Ribeira de acordo com o gênero.	73
Tabela III.5: Modelos de regressão linear múltipla considerando a pressão arterial sistólica e a pressão arterial diastólica.	77

Tabela IV.5: Valores de p na análise de regressão logística, considerando o <i>status</i> da pressão arterial (0 = normotenso; 1 = hipertenso), <i>odds ratio</i> e intervalo de confiança (IC), em três modelos de regressão distintos.	78
Tabela V.5: Frequências alélicas e genotípicas e resultados dos testes de χ^2 (1 grau de liberdade) [teste exato foi utilizado] para verificar se as populações se encontram em equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> .	79
Tabela VI.5: Resultados do teste de <i>Mann-Whitney</i> comparando normotensos (169 indivíduos) e hipertensos (119 indivíduos) dos remanescentes de quilombo em relação a suas estimativas de ancestralidade.	82
Tabela VII.5: Resultados da análise estatística MAX para a hipertensão como fenótipo dicotômico (critério OMS).	83
Tabela VIII.5: Resultados da análise estatística MAX para a hipertensão como fenótipo dicotômico (critério JNC).	84
Tabela IX.5: Resultados da análise estatística MAX para a pressão arterial como fenótipo contínuo.	85
Tabela X.5: Resultados das análises haplotípicas, comparando o fenótipo de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do <i>Joint National Commitee</i> (JNC).	87
Tabela XI.5: Resultados das análises haplotípicas, nas quais a pressão arterial foi tratada como fenótipo contínuo.	88
Tabela XII.5: Melhores modelos preditivos de interação gene-gene obtidos pelas análises GMDR.	89
Tabela I.6: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a hipertensão como fenótipo dicotômico (critério OMS).	101
Tabela II.6: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a hipertensão como fenótipo dicotômico (critério JNC).	102
Tabela III.6: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a pressão arterial sistólica e diastólica, analisadas separadamente.	103
Tabela IV.6: Resultados do FBAT em relação aos sete polimorfismos para a pressão arterial sistólica e diastólica, analisadas conjuntamente.	104
Tabela V.6: Resultados do FBAT em relação aos haplótipos no gene <i>GNB3</i> .	105
Tabela VI.6: Herdabilidade da pressão arterial sistólica e diastólica.	106

RESUMO

A hipertensão essencial, um problema de saúde pública mundial, é uma doença multifatorial, cujo componente genético varia entre 25 a 60%. Apesar da alta prevalência e incidência da hipertensão essencial em populações de ancestralidade africana, os estudos sobre o componente genético da hipertensão essencial têm sido primariamente realizados em populações de ancestralidade europeia ou asiática.

Dessa maneira, o objetivo geral deste trabalho foi investigar e quantificar potenciais fatores de risco genéticos associados à hipertensão essencial em populações dos remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira – SP, indivíduos afro-descendentes, oriundos de populações parcialmente isoladas, previamente bem caracterizadas do ponto de vista clínico, genealógico e genético-populacional.

A amostra foi constituída de 759 indivíduos adultos com estudo clínico e antropométrico oriundos das seguintes populações quilombolas: Abobral, Galvão, São Pedro, Pedro Cubas, André Lopes, Nhunguara, Sapatu, Pilões, Ivaporunduva, Maria Rosa, Poça e Reginaldo, localizadas no Vale do Ribeira, no estado de São Paulo.

Estimativas de ancestralidade (baseadas em 48 marcadores *INDEL* autossômicos) sugerem que a contribuição africana, europeia e ameríndia na amostra estudada é de aproximadamente 39,7%, 39,0% e 21,3%, respectivamente ($N=307$), sendo igualmente distribuídas em normotensos e hipertensos (37,6%, 39,0% e 19,9% e 41,1%, 37,8% e 20,4%, $P = 0,845$).

O estudo dos fatores de risco genéticos associados à hipertensão foi realizado por duas abordagens: (i) um estudo transversal com indivíduos não aparentados ($N = 383$) e (ii) um estudo de associação baseado em famílias (N total = 759, 79 famílias). Foram selecionados para estes estudos sete polimorfismos (I/D, Glu298Asp, C825T, G-350A, M235T, A/C, A486V) em seis genes candidatos com forte base funcional: *ACE*, *NOS3*, *GNB3*, *AGT*, *ADD2* e *GRK4*.

As análises do estudo transversal revelaram uma associação significativa entre o polimorfismo C825T do *GNB3* e a hipertensão essencial ($P=0,036$), quando consideramos o fenótipo mais extremo ($PAS \geq 160\text{mmHg}$ e/ou $PAD \geq 95\text{mmHg}$, ou uso de medicamentos anti-hipertensivos). Análises haplotípicas do *GNB3* (variantes G-350A e C825T) revelaram que cada cópia do haplótipo C825/G-350 aumenta em 1,73 a chance de hipertensão em relação ao haplótipo basal T825/G-350 ($OR = 1,73$; $IC\ 95\% = 1,05 - 2,84$, $P = 0,029$). O haplótipo C825/G-350 estaria relacionado com um aumento na média

esperada da PAS e da PAD ($\Delta = 6,07$ mmHg; IC de 95%: 1,64 – 10,50 mmHg; $P = 0,007$ e $\Delta = 3,75$ mmHg; IC de 95%: 1,16 – 6,35 mmHg; $P = 0,005$, respectivamente). Estudos de interação gene-gene também foram conduzidos pela técnica de redução de dimensionalidade de múltiplos fatores generalizada (GMDR). Os modelos de predição por GMDR revelaram interações de alta ordem entre as variantes avaliadas e o risco de hipertensão essencial. Os melhores modelos de interação foram: *NOS3/GRK4*, *ACE/GNB3/AGT* e *ACE/GNB3/AGT/ADD2/GRK4*, com uma acurácia média balanceada de teste de 60% ($P=0,006$), 59% ($P = 0,019$), e 59% ($P = 0,025$), respectivamente.

As análises de segregação em famílias indicaram uma associação significativa entre o polimorfismo G-350A do gene *GNB3* e a hipertensão essencial, quando consideramos o fenótipo classificado de acordo com o critério da OMS (PAS ≥ 140 mmHg e/ou PAD ≥ 90 mmHg, ou uso de medicamentos anti-hipertensivos, $P = 0,018$), e também quando consideramos o fenótipo mais extremo (PAS ≥ 160 mmHg e/ou PAD ≥ 95 mmHg, ou uso de medicamentos anti-hipertensivos, $P = 0,001$).

Finalmente, as estimativas da herdabilidade corroboram a noção de que o componente genético da pressão arterial é elevado nessas populações: herdabilidades (ajustadas para idade, gênero e IMC) de 36,1 e 42,9% para PAS e PAD, respectivamente.

Apresentamos nesse trabalho uma investigação extensiva e original sobre o componente genético da hipertensão essencial em uma população brasileira de afro-descendentes (com características históricas, genéticas e ambientais peculiares), reforçando a hipótese de um mecanismo poligênico de regulação da pressão arterial nas populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira - SP.

ABSTRACT

Essential hypertension is a worldwide public health problem. Although this pathology has a multi-factorial etiology, the heritability of blood pressure is high, ranging from 25 to 60%. Despite the high prevalence and incidence of essential hypertension among subjects of African ancestry, most genetic association studies has been carried out either in subjects with European descent or in Asian-derived individuals.

Thus, the aim of this study was to investigate genetic risk factors putatively associated with essential hypertension in the *quilombo* populations, which are partially isolated African-derived populations, well characterized in terms of clinical, genealogical and population data, living in the Ribeira River Valley – São Paulo, Brazil.

A total of 759 adults with clinical and anthropometric data sampled from the 12 populations (Abobral, Galvão, São Pedro, Pedro Cubas, André Lopes, Nhunguara, Sapatu, Pilões, Ivaporunduva, Maria Rosa, Poça and Reginaldo) were studied.

Ancestry estimates (based on 48 ancestry informative INDEL markers) suggested that the African, European and Amerindian contributions were 39.7%, 39.0% and 21.3% respectively ($N = 307$) to the studied sample. These proportions did not differ significantly between hypertensive and normotensive subjects (41.1%, 37.8%, 20.4% and 37.6%, 39.0% and 19.9%, respectively; $P = 0.845$).

Two approaches were employed to investigate potential genetic risk factors for essential hypertension: (i) a cross-sectional study with unrelated individuals ($N = 383$) and (ii) a family-based association study ($N = 759$, 79 families). Seven polymorphisms (I/D, Glu298Asp, C825T, G-350A, M235T, A/C, A486V) in six candidate genes with strong functional basis (*ACE*, *NOS3*, *GNB3*, *AGT*, *ADD2* and *GRK4*) were selected.

The cross-sectional study revealed a significant association between the C825T *GNB3* polymorphism and essential hypertension ($P = 0.036$) defined as a SBP ≥ 160 mmHg and/or DBP ≥ 95 mmHg, or use antihypertensive drugs). Haplotypic analyses of both G-350A and C825T *GNB3* variants indicated that each copy of the haplotype C825/G-350 increases in 1.73 the odds of hypertension compared to the reference T825/G-350 haplotype (OR = 1.73, CI 95% = 1.05 - 2.84, $P = 0.029$). The haplotype C825/G-350 was also associated with augmented levels of both SBP and DBP (expected mean difference, $\Delta = 6.7$, 95% CI: 1.64 – 10.50, $P = 0.007$ and $\Delta = 3.75$, CI 95%: 1.16 – 6.35, $P = 0.005$, respectively) compared to the reference haplotype. Gene-gene interactions were also investigated by the use of the generalized multifactor dimensionality reduction (GMDR). GMDR prediction models revealed high-order interactions for hypertension

between and among the studied variants. The best interaction models were *NOS3/GRK4*, *ACE/GNB3/AGT*, and *ACE/GNB3/AGT/ADD2/GRK4*, with an average testing balanced accuracy of 60% ($P = 0.006$) 59% ($P = 0.019$), and 59% ($P = 0.025$), respectively.

The family-based association study showed a significant association of the *GNB3* G-350 allele with essential hypertension ($P = 0.018$) when the diagnosis of essential hypertension was based on the WHO criteria (SBP ≥ 140 mmHg and / or DBP ≥ 90 mmHg, or use of antihypertensive drugs, $P = 0.018$). Qualitatively analogous results were observed when a more extreme phenotype was considered (i.e. hypertension defined as a SBP ≥ 160 mmHg and / or DBP ≥ 95 mmHg, or use of antihypertensive drugs, $P = 0.001$)

Finally, heritability estimates corroborated the notion that the genetic component of blood pressure is high in these populations. Heritability (adjusted for age, gender and BMI) estimates of 36.1 and 42.9% for SBP and DBP, respectively, were obtained.

We presented in this work an extensive and original investigation about the genetic component of essential hypertension in an African-Brazilian population (with peculiar historical, genetical and environmental characteristics). This study strengthens the hypothesis of a polygenic mechanism of regulation of blood pressure in the *quilombos* from Ribeira River Valley – São Paulo.

CAPÍTULO 1

1. Revisão bibliográfica

1.1. Epidemiologia da hipertensão

Hipertensão é o termo utilizado para designar a pressão arterial elevada crônica, de caráter patológico. Essa condição associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos como o coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, e também a alterações metabólicas, com consequente aumento no risco do surgimento de doenças cardiovasculares (DCVs). Quanto à sua etiologia, classifica-se a hipertensão como primária ou essencial aquela cuja manifestação não pode ser atribuída à existência de outra doença precedente, e como secundária, a hipertensão que se manifesta associada a outros distúrbios (Thibonnier & Schork, 1995).

A classificação da pressão arterial é baseada na média de duas ou mais medidas apropriadas, obtidas de duas ou mais leituras em pelo menos duas visitas ao consultório (Tabela I.1), para indivíduos com 18 anos ou mais. Quando as pressões arteriais sistólica e diastólica apresentam valores que se encontram em categorias diferentes, utiliza-se o maior valor para classificar a pressão arterial (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

Tabela I.1: Classificação da pressão arterial segundo as medidas obtidas em consultório.

Classificação	PAS	PAD
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130 – 139	85 – 89
Hipertensão estágio 1	140 – 159	90 – 99
Hipertensão estágio 2	160 – 179	100 – 109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

Mudanças na pressão arterial ocorrem com o avanço da idade. O aumento da pressão sistólica se dá ao longo de toda a vida, ao contrário da pressão diastólica, que se eleva até mais ou menos os 50 anos, tendendo a se estabilizar ou até mesmo a sofrer declínio após essa idade. A hipertensão diastólica é predominante antes dos 50 anos de idade, ocorrendo isoladamente ou combinada com a elevação da pressão sistólica. A prevalência da hipertensão sistólica aumenta com a idade, e por volta dos 50 anos, torna-se a forma mais comum de hipertensão. A pressão diastólica elevada é um fator de risco para doenças cardiovasculares mais importante do que a pressão sistólica até os 50 anos de

idade; depois dessa faixa etária, a pressão sistólica passa a ser o fator de risco mais importante (Chobanian e col., 2003).

A cada ano morrem 7,6 milhões de pessoas no mundo devido à hipertensão, segundo dados do Boletim Global de Doenças Relacionadas à Hipertensão (Lawes e col., 2008). A hipertensão arterial é responsável, segundo o documento, por 54% de todos os casos de acidente vascular cerebral (AVC) e 47% dos casos de infarto, fatais e não fatais, em todo o mundo. Na última década, a hipertensão fez mais de 70 milhões de vítimas fatais. A maioria das mortes ocorre em países em desenvolvimento econômico e mais da metade ocorre em indivíduos entre 45 e 69 anos.

Nos países mais desenvolvidos (*high-income countries*), somente 7% das mortes ocorridas antes dos 60 anos podem ser atribuídas à hipertensão, enquanto na África essa porcentagem sobe para 25% (*Global Health Risks*, OMS, 2009).

As doenças cardiovasculares emergiram como um significativo problema de saúde em vários países da África subsaariana. Estes, assim como diversos países de outras regiões do planeta, estão sob processo de transição epidemiológica, no qual as doenças crônicas não transmissíveis, como a hipertensão, vêm ganhando expressividade em detrimento das doenças transmissíveis. A transição epidemiológica é intimamente relacionada com as mudanças demográficas, sociais e econômicas dessas populações (Oladapo e col., 2010). Em 1992, Ekpo e col. encontraram a frequência de 8,1% de hipertensos numa população urbana da Nigéria. Estudos recentes mostram um quadro epidemiológico completamente distinto, com prevalência da hipertensão de cerca de 20% ou até mais em populações urbanas ou rurais da África subsaariana (Thorogood e col., 2007; Kengne e col., 2007; Oladapo e col., 2010).

A África é considerada o local de origem e dispersão do homem moderno. Num dos maiores eventos migratórios na história recente da humanidade, milhões de africanos foram trazidos como escravos para a América durante mais de três séculos. Esses indivíduos, que são oriundos de diversas populações da África (predominantemente do Oeste), miscigenaram-se uns com os outros e também com europeus, resultando em populações geneticamente heterogêneas.

Estudos com populações afro-descendentes em países desenvolvidos revelaram que a hipertensão é um problema de saúde muito frequente. Na população norte-americana geral, cerca de 25% dos adultos são hipertensos; entre os afro-descendentes a frequência da hipertensão pode chegar a 35% (Cooper e col., 1999). Cui e col. (2003) estimaram em 24% a frequência de adultos norte-americanos com hipertensão. Estudos feitos a partir de 1970 mostraram que a hipertensão responde por cerca de 20% da mortalidade em afro-descendentes e por apenas 10% da mortalidade em populações caucasianas norte-

americanas (Cooper & Rotimi, 1997). Considerando como hipertensas as pessoas que apresentam pressão arterial com valores acima de 140/90 mmHg, Cooper e Rotimi (1997) concluíram que a hipertensão é cerca de 50% mais freqüente em negros do que em brancos ou hispânicos nos Estados Unidos. Nesse trabalho considerou-se a hipótese que o quadro da ocorrência da hipertensão devia-se basicamente às condições sócio-econômicas inferiores compartilhadas por hispânicos e negros norte-americanos. Como a incidência de hipertensão entre os hispânicos se assemelhava à ocorrência do distúrbio em brancos e não às frequências encontradas em negros, reforçou-se o indício de que fatores genéticos devem ser importantes no fenótipo da hipertensão entre afro-descendentes. Um estudo realizado por Umscheid e col. (2010) em populações norte-americanas demonstrou que os pacientes negros mantêm a pressão arterial menos controlada do que os pacientes brancos.

Cooper e col. (2005) questionaram se de fato há maior prevalência de hipertensão em populações negras. Comparando negros africanos, caribenhos e norte-americanos com brancos norte-americanos, canadenses e europeus (85.000 participantes no total), encontraram frequências de 14-44% de hipertensos entre os negros e 27-55% entre os brancos. Analisando o modo de vida, situações de estresse e as condições sócio-econômicas dessas populações, os autores sugeriram que os fatores ambientais podem representar um impacto muito significativo no fenótipo da hipertensão. Esses resultados, no entanto, podem ter sido influenciados pelo delineamento experimental escolhido, no qual os países selecionados para o estudo não apresentavam de fato uma alta prevalência de hipertensão em negros. Também poderiam resultar de um viés sócio-econômico, segundo o qual as populações brancas teriam mais acesso aos tratamentos e por isso o número de brancos diagnosticados como hipertensos e em tratamento parece ser maior do que o de negros.

Crawford e col. (2010), investigando os efeitos do índice de massa corporal e da obesidade na prevalência de diabetes do tipo 2, hiperlipidemia e hipertensão em populações norte-americanas, encontraram as maiores proporções de diabéticos (12,1%) e hipertensos (28,9%) entre os afro-descendentes (Figura 1.1).

Figura 1.1: Prevalências do diabetes tipo 2, hiperlipidemia e hipertensão de acordo com a ancestralidade em populações norte-americanas (adaptado de Crawford e col., 2010).

No Brasil, 29,4 % das causas de morte são atribuídas às doenças cardiovasculares, sendo 12,8% destas causadas por hipertensão arterial sistêmica (Figura 2.1). Estudos da década de 1980 até o ano de 2001, realizados em diversos estados brasileiros, observaram prevalências de hipertensão entre 10% e 42%, dependendo da região, subgrupo e critério diagnóstico utilizado (Lessa, 2001). Na realidade, a hipertensão arterial, doença mais frequente no Brasil, não tem sua prevalência conhecida no país como um todo (Rosário e col., 2009).

Figura 2.1: Taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares e suas diferentes causas no Brasil. AVE = acidente vascular encefálico; DIC = doença isquêmica do coração; HAS = hipertensão arterial sistêmica. (Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

Jardim e col. (1992) realizaram um estudo epidemiológico e encontraram uma baixa frequência de hipertensão arterial (6,28%) em uma população quilombola Kalunga (em Goiás), isolada. Sichieri e col. (2001) relataram diferenças quanto à ocorrência da hipertensão: as mulheres negras de uma população miscigenada do Rio de Janeiro apresentavam maior probabilidade de desenvolverem hipertensão em relação às brancas e mulatas. Devido ao fato de haver estudos pouco conclusivos relatando a ocorrência da hipertensão em afro-brasileiros, são necessárias novas investigações para que se esclareça se há ou não uma alta prevalência de hipertensos, como tem sido relatado em diversos

trabalhos com afro-descendentes de outros países, analisando-se qual é a real contribuição dos fatores ambientais (dieta, hábitos e modo de vida) e dos fatores genéticos no desenvolvimento e na ocorrência da hipertensão.

1.2. Fisiologia da regulação da pressão arterial

Diversos sistemas fisiológicos estão relacionados à homeostase da pressão arterial: o sistema renina-angiotensina-aldosterona, o sistema dopaminérgico, o equilíbrio de sódio e eletrólitos, o sistema endotelial e a transdução de sinais intracelulares.

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um dos mais importantes mecanismos fisiológicos de controle da pressão arterial (Figura 3.1). A renina é sintetizada pelas células justaglomerulares dos rins. Quando há queda da pressão arterial, a renina é liberada no sangue. A renina tem função enzimática e cataliza a hidrólise do angiotensinogênio, que é produzido no fígado e liberado na circulação. Quando o angiotensinogênio é clivado, ocorre liberação de angiotensina I; outra enzima, a enzima conversora de angiotensina (ECA), presente nos pulmões e tecidos vasculares, converte a angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor. A angiotensina II age por meio de dois receptores: AT1 e AT2, expressos em diversos tecidos, inclusive em tecidos cardiovasculares. Tanto o AT1 como o AT2 pertencem à classe de receptores acoplados à proteína G. A angiotensina II, mediada pelo receptor AT1, age no controle da pressão arterial provocando vasoconstrição, liberação de aldosterona pela glândula adrenal e estimulando a retenção de sal nos túbulos renais (revisões em Connell & Davies, 2005; Bader & Ganten, 2008; Siragy & Carey, 2010). A aldosterona, sintetizada na zona glomerulosa do córtex da glândula adrenal, é o principal hormônio mineralocorticoide. A ação da aldosterona regula o volume de fluido corporal e mantém a homeostase de íons, pois atua nos rins, via receptores de mineralocorticóides, induzindo a reabsorção de íons sódio e de água e aumentando a excreção de íons potássio. A aldosterona também modula o tônus vascular, possivelmente aumentando a resposta vasopressora à catecolamina e diminuindo a resposta vasodilatadora à acetilcolina, ou pela estimulação dos receptores de angiotensina II (revisões em Connell & Davies, 2005; Funder, 2010; Carey, 2010). A aldosterona aumenta a reabsorção de íons sódio atuando sobre a regulação dos canais de sódio epiteliais ou canais amilorida-sensíveis (ENaC), que estão presentes no duto coletor do rim (revisão em Snyder, 2005). O papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona, basicamente, é regular o fluido extracelular e o equilíbrio de íons, regulando, consequentemente, a pressão arterial.

Figura 3.1: Sistema renina-angiotensina-aldosterona. A renina sintetizada nos rins metaboliza seu substrato angiotensinogênio (produzido no fígado) no plasma, liberando a angiotensina I. A enzima conversora de angiotensina (ECA), produzida na superfície do tecido pulmonar e nas células endoteliais renais, cataliza a conversão de angiotensina I em angiotensina II. A angiotensina II interage com receptores, principalmente os AT1, em diversos órgãos-alvo, levando a efeitos como a retenção de sódio, vasoconstrição e secreção de aldosterona (Adaptado de Bader, 2010).

Outro mecanismo importante na regulação da pressão arterial é o sistema dopaminérgico. A dopamina, sintetizada nos túbulos renais proximais, reduz a reabsorção de sódio pelos túbulos renais proximais inibindo o transporte de íons sódio. O sistema dopaminérgico exerce sua função por meio da ativação de receptores de superfície celular acoplados a proteínas G. A estimulação destes receptores é capaz de regular a excreção de água e eletrólitos atuando indiretamente sobre a hemodinâmica renal e a liberação de hormônios e peptídeos vasoativos. As proteínas G acopladas a receptores do tipo quinase (GRKs) desempenham papel importante na fosforilação, dessensibilização e internalização dos receptores de dopamina (revisões em Zeng e col., 2004; Staessen e col., 2008; Jose e col., 2010).

Um dos produtos mais importantes das células endoteliais é o óxido nítrico. O óxido nítrico endotelial (ON) é produzido constitutivamente nas células endoteliais a partir da conversão do aminoácido L-arginina por uma enzima do tipo sintase (eNOS). O ON participa de três mecanismos regulatórios que são fundamentais para a regulação do fluxo sanguíneo e, consequentemente, da pressão arterial: 1 – controle do tônus vascular, 2 –

adaptação do fluxo sanguíneo conforme a demanda de determinado tecido e 3 – adaptação do calibre dos vasos conforme o volume do influxo sanguíneo (Pereira e col., 2006).

As proteínas G desempenham um papel fundamental nos processos de sinalização intracelular. O aumento da atividade de canais de íons sódio e hidrogênio poderia representar potencialmente o aumento da reabsorção de íons sódio pelos túbulos renais, o que levaria ao incremento do volume sanguíneo devido à captação de água por osmose, acarretando na elevação da pressão arterial. A atividade dos canais de íons sódio e hidrogênio (entre outros) é controlada por sinais intracelulares. O grupo de pesquisa de Siffert (2005) caracterizou as vias de estímulo e resposta em culturas de linfócitos de pacientes hipertensos, verificando um aumento da sinalização por íons cálcio e a formação de mensageiros intracelulares secundários. Esta alteração poderia representar uma resposta a um incremento da ativação de proteínas G nas células em cultura oriundas dos pacientes hipertensos.

1.3. Genética da hipertensão

A compreensão da genética da pressão arterial nunca foi simples. Com o advento de novas tecnologias que facilitaram a detecção de variantes genéticas, a pressão arterial passou a ser alvo de estudos genéticos por volta da década de 1980, com os estudos de genes candidatos classicamente relacionados à regulação da pressão arterial (Harrap, 2009). Quaisquer pequenas variações na pressão sanguínea podem representar um impacto substancialmente considerável no aumento do risco de doenças cardiovasculares. A pressão arterial é uma característica hereditária e estimativas de herdabilidade sugerem que 15-60% da variação da pressão sistólica e diastólica podem ser atribuídas a fatores genéticos (Norton e col., 2010). Porém, a “arquitetura genética” precisa da regulação da pressão arterial – definida pelo número de variantes genéticas, suas frequências e seus efeitos nos fenótipos – que permeia essa elevada herdabilidade permanece desconhecida (Arora & Newton-Cheh, 2010).

1.3.1. Hipertensão hereditária monogênica

As formas de herança mendeliana de hipertensão são raras, correspondendo a menos de 1% de todos os casos de hipertensão (Rafiq e col., 2010).

Estudos diversos revelaram que os sistemas de reabsorção de íons pelos rins e de controle do volume sanguíneo são os principais responsáveis pela origem da hipertensão monogênica. As mutações genéticas afetam principalmente a síntese de mineralocorticóides, as funções dos receptores de mineralocorticóides, canais de sódio epiteliais e regulação destes canais (Rosskopf e col., 2007; revisão em Citterio e col., 2010).

A Tabela II.1 apresenta uma relação de síndromes genéticas humanas descritas até o momento, cujo principal sinal clínico é a hipertensão.

Tabela II.1: Relação de síndromes genéticas humanas descritas até o momento em que a hipertensão é o principal sinal clínico (*genes candidatos sugeridos no trabalho de Lafferty e col., 2000; adaptado de Rosskopf e col., 2007, Tobin e col., 2008 e Vehaskari 2009).

Síndrome	Padrão de herança	Localização Cromossômica	Genes candidatos
Síndrome de Liddle	AD	16p13	<i>SCNN1B / SCNN1G</i>
Síndrome de Gordon	AD	12p13 e 17q21	<i>WNK1 e WNK4</i>
Excesso aparente de mineralocorticoide (AME)	AR	16q22	<i>HSD11B2</i>
Pseudohipoaldosteronismo tipo I autossômico dominante (PHA I) e doença hipertensiva da	AD	4q31.1	<i>NR3C2</i>
Pseudohipoaldosteronismo tipo I autossômico recessivo (PHA I)	AR	12p13 e 16p13	<i>SCNN1A e SCNN1B / SCNN1G</i>
Aldosteronismo tratável com glicocorticoide (GRA)	AD	8q21	<i>CYP11B1 / CYP11B2</i>
Hiperaldosteronismo familiar II (FH II)	AD	7p22	<i>GPR30/ PMS2/ PRKAR1B/ADAP1*</i>
Hiperplasia congênita da suprarrenal com deficiência de 11 ou 17-hidroxilase (CAH)	AR	8q21	<i>CYP11B1</i>
Resistência familiar a glicocorticoide (FGR)	AR/AD	5q31.3	<i>NR3C1</i>
Hipertensão com braquidactilia de herança autossômica dominante	AD	12p12.2-p11.2	<i>PDEA3 / KCNJ8 / ABCC9</i>

AD = autossômico dominante. AR = autossômico recessivo.

1.3.2. Hipertensão essencial

A hipertensão essencial é um distúrbio de mecanismo multifatorial, pois resulta da interação entre diversos fatores genéticos (ou seja, tem herança poligênica) e ambientais. São conhecidos diversos fatores ambientais que contribuem para elevar a pressão arterial (consumo excessivo de sal, consumo de álcool, tabagismo, excesso de peso, estresse, sedentarismo), e os fatores genéticos responsáveis pela predisposição à hipertensão têm sido exaustivamente investigados.

Enquanto as formas monogênicas de hipertensão são raras, a hipertensão essencial como doença multifatorial afeta mais de 20% da população adulta em países industrializados (Roskopf e col., 2007; Rafiq e col., 2010).

No caso da hipertensão essencial, muitos genes candidatos têm sido analisados, incluindo os que codificam componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), aducinas, β -adrenoceptores, subunidades de proteínas G, proteínas regulatórias de sinalização das proteínas G, quinases Rho e receptores do tipo quinase acoplados a proteínas G (Roskopf e col., 2007).

Mesmo após 20 anos de pesquisa sobre genes candidatos, não se tem ainda um consenso sobre o papel exato de cada um na gênese da hipertensão essencial.

1.4. Estratégias de estudo genético da hipertensão

O mapeamento de genes de doenças multifatoriais ou complexas tem sido impulsionado pelo avanço tecnológico na identificação e genotipagem de marcadores polimórficos de DNA de diversos tipos. Atualmente, os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), o tipo mais frequente de polimorfismo genético, dado que existem mais de 3 milhões de SNPs espalhados pelo genoma humano (International HapMap Consortium, 2007), são os marcadores mais utilizados.

O estudo genético de doenças complexas (multifatoriais) pode ser feito basicamente por meio de duas estratégias, os estudos de associação e de ligação.

1.4.1. Estudos de ligação

Os estudos de ligação baseiam-se no conceito de ligação genética, que se descreve com a tendência de alelos em dois locos distintos, mas localizados muito próximos numa mesma região cromossômica, não sofrerem recombinação entre si e, portanto, serem transmitidos em conjunto na meiose. Esses locos podem ser tanto os genes responsáveis por determinadas características fenotípicas quanto marcadores genéticos polimórficos sem efeito no fenótipo. Em geral, são utilizados para se estudar a transmissão de um segmento cromossômico de uma geração para a outra em uma genealogia e compará-la com o padrão

de transmissão de uma doença. Desse modo, pode-se definir uma região cromossômica candidata a conter o gene responsável pela doença. Um marcador genético ideal deve se apresentar em alta frequência de heterozigose na população. Os microsatélites são um dos tipos de marcadores mais utilizados nos estudos de ligação devido à sua natureza multialélica e, em geral, apresentarem-se na população em alta taxa de heterozigose. Essa abordagem é feita sem pré-conhecimento sobre a função dos genes e facilita a identificação, nas regiões cromossômicas ligadas à condição estudada, de genes de predisposição, tanto os já descritos como aqueles ainda não conhecidos.

A análise estatística utilizada para definir se os resultados de um estudo de ligação são significativos, excluindo ou comprovando ligação entre o marcador e a entidade clínica em estudo é o cálculo do *lod score* ou logaritmo das chances.

Os estudos de ligação em doenças complexas utilizam métodos diferenciados daqueles utilizados para fenótipos mendelianos. A análise pelo *lod score* dito paramétrico, utilizado em estudos de doenças mendelianas, não pode ser utilizado por requerer premissas que na maioria das vezes não são possíveis de se estabelecer em estudos de doenças complexas: modo de herança e informações de penetrância. Uma abordagem possível para se realizar um estudo de ligação em doenças complexas é utilizar famílias nas quais a segregação da doença se dá de maneira quase mendeliana. A análise de segregação, uma ferramenta estatística que avalia a herdabilidade de uma determinada característica, define os parâmetros para um modelo genético nessas famílias, que desta forma poderão ser utilizados nas análises do *lod score* paramétrico (Stracham & Read, 2010).

Métodos não paramétricos de análises não requerem um modelo genético estabelecido, portanto, são apropriados para os estudos de ligação com doenças complexas. Porém, os estudos de ligação para doenças complexas não têm sido muito bem sucedidos em se mapear locos de susceptibilidade. O baixo sucesso em se mapear regiões cromossômicas que conferem susceptibilidade a doenças complexas sugerem que a maioria dos fatores genéticos tem efeito modesto no fenótipo e são extremamente heterogêneos, havendo necessidade de grande poder estatístico para serem detectados. Uma forma de se obter o poder estatístico almejado é trabalhar com um número amostral muito grande. No entanto, Risch & Merikangas (1996) demonstraram que o poder estatístico para se detectar efeitos modestos de variantes comuns pode ser alcançado mais facilmente através de estudos de associação ao invés de estudos de ligação.

Os estudos de ligação com formas mendelianas de hipertensão e hipotensão têm identificado com sucesso variantes raras que têm grande efeito nos fenótipos em questão. Apesar dessas variantes raras apresentarem um papel crucial na variação da pressão arterial

dentro das famílias estudadas, o papel que as mesmas exercem na variação da pressão arterial na população geral permanece desconhecido (Arora & Newton-Cheh, 2010).

Recentemente, a estratégia que vem sendo muito utilizada na busca por genes de regulação da pressão arterial e da susceptibilidade à hipertensão essencial são os estudos de ligação genômica em larga escala – os *genomewide linkage studies*. Alguns estudos encontraram ligação ou sugestão de ligação entre a hipertensão essencial (ou a pressão arterial) e locos de susceptibilidade em cromossomos diversos. Mas nenhum resultado de ligação significativa das QTLs (*Quantitative Trait Loci*) identificadas foi replicado em mais de uma população (revisão em Binder, 2007).

1.4.2. Estudos de associação

Associação é um termo estatístico que descreve a co-ocorrência entre alelos e fenótipos. Em contraste com os estudos de ligação, que são apropriados para se detectar grandes efeitos de variantes raras, os estudos de associação são adequados para se detectarem efeitos genéticos moderados ou pequenos das variantes frequentes (Arora & Newton-Cheh, 2010; Ehret, 2010).

Nos estudos de associação são comparadas as frequências alélicas de um marcador polimórfico, ou conjunto de marcadores, entre indivíduos não aparentados com o fenótipo (afetados) e sem o fenótipo (não afetados). Os marcadores mais utilizados são os SNPs, por serem muito numerosos. O polimorfismo em estudo pode ter ação biológica direta no fenótipo da doença ou então o marcador polimórfico pode estar em desequilíbrio de ligação com os genes candidatos que determinam susceptibilidade a essa doença.

A história dos estudos de associação iniciou-se com a investigação de polimorfismos em genes candidatos, analisados individualmente e de maneira independente.

Os avanços tecnológicos na área da genética e da genômica permitiram análises simultâneas de centenas de milhares de marcadores por um custo razoavelmente baixo, promovendo a expansão dos estudos de associação genômica em larga escala (*Genomewide Associations Studies* - GWAS). Nesse tipo de estudo buscam-se novos locos contendo genes de susceptibilidade a diversas doenças complexas, por meio de varreduras do genoma, utilizando-se plataformas que analisam milhares de SNPs simultaneamente (Johnson & O'Donnell, 2009). Estudos de associação genômica em larga escala, conduzidos em populações européias, não revelaram nenhuma variante genética significativamente associada à hipertensão. No entanto, em um estudo conduzido em uma população de afro-americanos, foram evidenciadas associações entre diversos genes e a pressão arterial

sistólica; dentre esses genes, dois potencialmente desempenham um papel importante na regulação da pressão arterial (Adeyemo e col., 2009).

Dado que muitas vezes os efeitos dos polimorfismos genéticos são muito pequenos sobre o fenótipo e sua detecção nem sempre é fácil do ponto de vista estatístico, uma abordagem complementar para testar a associação entre marcadores genéticos e um fenótipo é a avaliação das interações gene-gene ou epistasia, uma vez que é cada vez mais evidente que este mecanismo desempenha papel fundamental na susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças complexas (Moore, 2003). Uma metodologia que pode ser empregada para avaliar possíveis efeitos da interação gene-gene no risco de desenvolver o fenótipo estudado é a Redução de Dimensionalidade de Múltiplos Fatores (MDR, do inglês *multifactor dimensionality reduction*) [Namkung e col., 2009].

Haplótipos compostos por SNPs adjacentes podem contribuir com maior informação do que SNPs avaliados individualmente, possibilitando maior poder de exploração da associação entre genes candidatos e doenças complexas. Informações contidas nas regiões flangeadoras do marcador são ignoradas quando analisamos um marcador individualmente. Akey e col. (2001) demonstraram através de uma fórmula analítica explícita que a análise de haplótipos aumenta o poder de detecção de associação, aumentando a robustez dos testes. Zolner e Von Haeseler (2000) utilizaram uma abordagem para estudar desequilíbrio de ligação entre SNPs e sugeriram que haplótipos construídos com dois SNPs são muito eficientes em se detectar associação.

Um problema frequentemente encontrado em estudos de associação, e talvez a maior razão para a inconsistência de seus resultados, é a estratificação populacional. Verifica-se estratificação populacional quando os casos e controles apresentam frequências de alelos e genótipos distintas atribuídas à diversidade do *background* das amostras, independente do *status* da condição que está sendo analisada (Cardon & Palmer, 2003). Uma solução para se tentar contornar a estratificação é a utilização de casos e controles provenientes de uma amostra com o mesmo *background* genético. Pritchard & Rosenberg (1999) preconizam a utilização de marcadores genéticos não ligados espalhados pelo genoma para averiguar a diversidade do *background* genético nos estudos de associação, principalmente devido à ancestralidade. Dessa maneira, as diferenças de *background* genéticos das amostras podem ser testadas e quantificadas e, na ausência de diferença significativa, o estudo pode ser validado.

Já os estudos de associação que empregam metodologias baseadas na transmissão dos polimorfismos nas famílias têm a vantagem de que, se a transmissão é avaliada dentro de uma mesma família, os indivíduos em geral têm a mesma ancestralidade e efeitos de estratificação seriam evitados. Os métodos com abordagens baseadas em famílias procuram

avaliar se determinados alelos são transmitidos aos afetados em frequências diferentes às esperadas pela segregação mendeliana, o que poderia sugerir associação real entre alelos ou genótipos com a susceptibilidade ao distúrbio.

O Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT - *Transmission Disequilibrium Test*), proposto por Spielman e col. em 1993, avalia com que frequência um alelo associado a uma determinada doença é transmitido de pais heterozigotos em relação a esse alelo para o filho afetado. Comparado aos estudos convencionais de ligação, o TDT não requer famílias em que existam muitos afetados, nem necessita de informações dos irmãos normais do afetado. No entanto, o TDT só considera informações de trios (pai-mãe-filho) e só pode detectar ligação entre o marcador estudado e o loco que contém genes de susceptibilidade à doença se a associação estiver presente. Martin e col. (1997) e Lazzeroni & Lange (1998) estenderam o TDT, permitindo o estudo de famílias que apresentavam mais de um afetado, ao contrário do TDT proposto inicialmente por Spielman e col. (1993).

Laird e col. (2000) e Rabinowitz & Laird (2000) propuseram uma abordagem unificada de teste de associação baseado em famílias (FBAT - *Family-Based Association Test*), baseada no TDT proposto por Spielman e col. (1993). O FBAT contempla diferentes modelos genéticos, diferentes amostragens, diferentes fenótipos da doença, além de permitir a ausência de informações parentais. Semelhantemente ao TDT, o FBAT compara as frequências genóticas observadas e esperadas (pela segregação mendeliana) nos afetados, sob as hipóteses nulas de “não ligação e não associação” ou “não associação na presença de ligação”. Laird & Lange (2006) estenderam o FBAT, permitindo a incorporação de dados longitudinais e o estudo de fenótipos binários ou quantitativos.

A literatura sobre estudos de associação de genes candidatos e fenótipos complexos, como é o caso da hipertensão, é extremamente vasta. Associações significativas são encontradas entre polimorfismos variados em diversas populações, mas seus resultados são controvertidos. A falta de reprodutibilidade dos resultados de associação pode ser gerada por diversos fatores de “confusão” que podem permear os diferentes estudos, como a presença de estratificação populacional, a interação entre efeitos ambientais com os fatores genéticos, o efeito diferenciado de um determinado polimorfismo nas diversas populações, efeito modesto das variantes gênicas no fenótipo, presença de interações gênicas (epistasia), entre outros. Mesmo quando se busca alcançar um poder estatístico adequado para se detectar associações entre genes e hipertensão, os fatores de confusão dificultam a interpretação dos estudos de associação (Citterio e col., 2010).

1.5. Genes candidatos selecionados para esse estudo

Foram selecionados para esse estudo alguns polimorfismos presentes em genes candidatos que participam de vias regulatórias da pressão arterial.

Devido ao papel principal do sistema renina-angiotensina-aldosterona na regulação em longo prazo da pressão arterial, é óbvio considerar em primeiro lugar os genes que codificam os componentes desse sistema como candidatos a explicar a gênese da hipertensão, e os mais estudados são o *ACE* e o *AGT*. Genes cujos produtos estão envolvidos direta ou indiretamente na homeostase do volume sanguíneo e/ou com o equilíbrio de Na^+ são candidatos promissores para os estudos de associação, como os genes que codificam as subunidades da aducina (*ADD2*, por exemplo). As proteínas G mediam efeitos intracelulares que estimulam a atividade dos vasos sanguíneos, portanto, estudos do gene *GNB3*, que codifica uma das subunidades da proteína G, justificam-se. O sistema endotelial, que consiste de uma série de peptídeos e receptores, é potencialmente importante para o controle da pressão arterial; diversos estudos com polimorfismos no gene *NOS3* têm sido descritos. O sistema dopaminérgico renal está relacionado com o equilíbrio de íons, pois é importante por promover a excreção de sódio. Os receptores dopaminérgicos, especialmente os D_1 , tem sua função relacionada à atividade dos receptores do tipo quinase acoplados a proteínas G do tipo 4, codificados pelo gene *GRK4*. Nas seções seguintes apresentamos uma breve revisão bibliográfica descrevendo alguns estudos de associação entre os genes candidatos selecionados e fenótipos da hipertensão essencial.

1.5.1. O gene *ACE*

A enzima conversora de angiotensina em angiotensina II (ACE) é um componente-chave no sistema renina-angiotensina e tem sido considerada como um fator relacionado à gênese da hipertensão e de doenças cardiovasculares. O gene que codifica a enzima conversora de angiotensina (*ACE*) está localizado no cromossomo 17 (em 17q23). O polimorfismo *ACE* I/D (rs1799752) foi identificado em 1990 por Rigat e col., e foi o mais estudado. Este polimorfismo é caracterizado pela presença (I) ou ausência (D) de um elemento *Alu* de 287pb no intron 16 do gene *ACE*.

Foram encontradas diferenças significativas nos níveis de enzima conversora de angiotensina (ECA) sérica de indivíduos saudáveis, relacionados aos três possíveis genótipos (I/I, I/D, D/D). Como as variantes desse polimorfismo se refletem nos diferentes níveis de ECA sérica, sugeriu-se que o gene *ACE* desempenha um papel significativo na patogênese da hipertensão essencial. A Tabela III.1 resume alguns estudos com achados positivos de associação entre polimorfismos do gene *ACE* e a ocorrência de hipertensão ou ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. No entanto, os estudos sobre a associação do polimorfismo I/D do gene *ACE* têm apresentado resultados conflitantes, e nem sempre foi confirmada essa associação (Zhu e col., 2001; Pereira e col., 2003; Mondry e col., 2005).

A meta-análise realizada por Staessen e col. (1997), incluindo estudos de populações caucasianas, negras e asiáticas de diversos países, revelou uma associação significativa do polimorfismo I/D no gene *ACE* apenas com os asiáticos. Possíveis explicações para esses resultados controvertidos seriam: tamanho amostral inadequado de muitos estudos, o que resulta em um poder estatístico reduzido; diferenças nos critérios de seleção dos casos e controles de cada trabalho; diferenças ambientais; estratificação populacional; diferenças das faixas etárias estudadas por cada grupo; e possivelmente um viés de publicações apenas de achados positivos (Pereira e col., 2003). Em uma meta-análise mais recente de estudos de associação realizada com a população chinesa Han, o genótipo DD está significativamente associado ao risco da hipertensão essencial (Ji e col., 2010).

Tabela III.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene *ACE*.

País (população)	N	Desenho do estudo	Polimorfismo	Particularidades da associação encontrada	Referências
Diversos países (diversos grupos populacionais).	49.959	Meta-análise	I/D	Associação somente em populações asiáticas	Staessen e col., 1997
EUA (participantes do <i>Framingham Heart Study</i> , maioria caucasianos)	3.095	Estudo de coorte	I/D	Associação com a hipertensão e aumento da pressão diastólica em homens	O'Donnell e col., 1998
EUA (membros de 583 famílias do <i>Rochester Family Heart Study</i>)	3.653	Estudo de coorte	(AAAG) _n (AG) _m	Associação com a variação da pressão diastólica e média da pressão arterial, principalmente em homens	Fornage e col., 1998
Nigéria (332 famílias do <i>International Collaborative Study on Hypertension in Blacks</i>)	1.343	Estudo de coorte	A-262T A11860G	Explicam a variação da concentração da enzima e associação com o aumento da pressão arterial	Zhu e col., 2001
Bangladesh (população urbana)	103	Caso-controle	I/D	Associação com a hipertensão em homens	Morshed e col., 2002
Brasil (afro-brasileiros da zona rural do Mato Grosso do Sul)	184	Caso-controle	I/D	Associação com a hipertensão em homens	Sakuma e col., 2004
Paquistão	108	Caso-controle	I/D	Associação com a hipertensão em homens e mulheres jovens	Ismail e col., 2004
Itália (caucasianos)	684	Estudo de coorte	I/D	Associação com a hipertensão em indivíduos mais velhos	Di Pasquale e col., 2004
Coréia	13.914	Estudo de coorte	I/D	Associação com a hipertensão em homens	Yoo, 2005
Coréia (adolescentes)	60	Caso-controle	I/D	Alelo D associado com o aumento dos níveis de ACE sérico	Park e col., 2009
Índia	910	Caso-controle	I/D	Interação gênica entre alelo D e alelos de risco dos genes <i>NOS3</i> e <i>AGT</i>	Kumar e col., 2009
China (população Han)	19.764	Meta-análise	I/D	Genótipo DD associado com a hipertensão essencial	Ji e col., 2010

1.5.2. O gene *AGT*

Em estudos clínicos e experimentais, a administração de inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) tem se mostrado efetiva em baixar os níveis de pressão arterial. Assim, genes codificadores de componentes do SRAA são potenciais candidatos a desempenhar um papel na regulação da pressão arterial. Aumento dos níveis de angiotensinogênio plasmático pode levar a um incremento da formação de angiotensina II, resultando em hipertensão (Kumar e col., 2005).

Jeunemaitre e col. (1992) foram os primeiros a relatar evidências de ligação e associação de variantes no gene *AGT* (localizado no cromossomo 1, em 1q42-q43 e que codifica o angiotensinogênio) com a hipertensão, especialmente um polimorfismo denominado M235T (rs669). Desde então a associação deste polimorfismo com a hipertensão essencial tem sido replicada com sucesso em muitos estudos, em diversas populações independentes. Pereira e col. (2003) encontraram associação dose-dependente entre o alelo T do polimorfismo M235T e a variação da pressão arterial em uma população urbana miscigenada de Vitória – ES.

Outro polimorfismo, localizado na região promotora do gene *AGT* (A/G), foi associado com o fenótipo da hipertensão: o alelo –217A do polimorfismo A/G estaria relacionado com o aumento da atividade transcricional do *AGT* humano (Jain e col., 2002).

Associação entre a hipertensão e haplótipos do gene do angiotensinogênio também já foi relatada (Tsai e col., 2003). Apesar dos resultados negativos (Brand e col., 1998; Niu e col., 1999; Rodriguez-Perez e col., 2000; Matsubara e col., 2003), estudos de meta-análise demonstraram que resultados positivos de associação têm sido replicados em diferentes populações (Staessen e col., 1999; Ji e col., 2010).

A Tabela IV.1 mostra o resumo de diversos estudos de associação, com resultado significativo, com o gene *AGT*.

Tabela IV.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene *AGT*.

País (população)	N	Desenho do estudo	Polimorfismo	Particularidades da associação encontrada	Referências
França (caucasianos)	841	Caso-controle	M235T	Associação com a hipertensão em franceses e japoneses	Jeunemaitre e col., 1997
Japão	214				
Diversos países (diversos grupos populacionais)	27.906	Meta-análise	M235T	Genótipo TT associado com aumento do risco de hipertensão em caucasianos	Staessen e col., 1999
Japão	1.232	Meta-análise	M235T	Alelo T associado a um incremento de 60% no risco de hipertensão	Kato e col., 1999
EUA (afro-americanos) (caucasianos)	342 262	Caso-controle	A-217G	Associação com o aumento da atividade transcricional do gene <i>AGT</i>	Jain e col., 2002
Romênia	59	Caso-controle	M235T	Alelo T aumenta a predisposição a desenvolver hipertensão	Procopciuc e col., 2002
EUA	1.041	Caso-controle	M235T	Associação com um menor risco de infarto com o uso de inibidores de ECA para aqueles com o genótipo ThrThr	Bis e col., 2003
Brasil (população miscigenada do Espírito Santo)	1.421	Caso-controle	M235T	Associação com o risco de hipertensão em homens e mulheres quando em homozigose	Pereira e col., 2003
EUA (afro-americanos) (caucasianos)	342 263	Caso-controle	A-217G	Associação em afro-americanos	Kumar e col., 2005
Alemanha	1.358	Meta-análise	M235T	Associação com um risco menor de hipertensão em mulheres	Mondry e col., 2005
Nigéria (da zona rural) e EUA (afro-americanos da zona metropolitana de Chicago)	595 901	Estudo baseado em famílias	C-532T M235T A-6G	Altos níveis de AGT plasmático em nigerianos e baixos níveis de AGT plasmático em afro-americanos	Fejerman e col., 2006
China (população Han)	19.764	Meta-análise	M235T	Genótipo TT associado com a hipertensão essencial	Ji e col., 2010

1.5.3. O gene *GNB3*

Outro gene relacionado à hipertensão é o *GNB3*, localizado no cromossomo 12 (em 12p13) e que codifica a subunidade $\beta 3$ das proteínas G heterotriméricas. Siffert e col. (1998) descreveram o polimorfismo C825T (rs5443) no exon 10 do gene; o alelo 825T estaria associado ao *splicing* alternativo deste gene, originando uma proteína $G\beta 3$ funcional com 41 aminoácidos a menos do que a proteína normal; essa proteína mutada pode estar relacionada com um aumento da atividade das proteínas G. Siffert e col. (1999a,b) sugeriram que possivelmente a presença do alelo 825T tornaria o indivíduo mais susceptível à obesidade e, conseqüentemente, este indivíduo possuiria maior propensão em desenvolver a hipertensão. Dong e col. (1999) sugeriram que o mecanismo no qual o alelo 825T estaria associado à gênese da hipertensão está relacionado aos canais de íons sódio e hidrogênio. O aumento da atividade destes canais poderia representar o aumento da reabsorção de íons sódio pelos túbulos renais, o que levaria ao incremento do volume sanguíneo devido à captação de água por osmose, acarretando na elevação da pressão arterial. A presença de apenas um alelo 825T é suficiente para a expressão da variante mutada da proteína $G\beta 3$ (Sartori e col., 2003). Nesse estudo, verificou-se que ocorreu vasoconstrição em indivíduos saudáveis portadores do alelo 825T quando estes recebiam substâncias vasoconstritoras como a angiotensina II.

O calibre dos vasos sanguíneos da retina é uma característica determinada geneticamente e parece estar relacionada à susceptibilidade de um indivíduo desenvolver a hipertensão. Sun e col. (2009) estudaram 1.842 indivíduos brancos e afro-descendentes americanos em relação a SNPs em três genes candidatos a estarem associados à hipertensão, entre eles o *GNB3*, para verificar se havia associação entre esses genes e o calibre dos vasos sanguíneos da retina. Não observaram nenhuma associação significativa entre os polimorfismos e o fenótipo estudado. Outros estudos também não verificaram associação de polimorfismos no gene *GNB3* e a hipertensão (Brand e col., 1999; Huang e col., 2003; Wang e col., 2004a).

A Tabela V.1 resume alguns estudos de associação entre o gene *GNB3* e a ocorrência da hipertensão e fenótipos relacionados.

Tabela V.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene *GNB3*.

País (população)	N	Desenho do estudo	Polimorfismo	Particularidades da associação encontrada	Referências
Alemanha	853	Caso-controle	C825T	Associação do alelo T	Siffert e col., 1998
Alemanha (participantes do WHO-MONICA)	608	Caso-controle	C825T	Associação do alelo T e variação da PAD e dos níveis de renina plasmática	Schunkert e col., 1998
Inglaterra (afro-descendentes)	495	Caso-controle	C825T	Associação com a hipertensão em homens e mulheres	Dong e col., 1999
Espanha	86	Caso-controle	C825T	Associação do alelo T e a hipertrofia do ventrículo esquerdo	Poch e col., 2000
Alemanha	2.052	Caso-controle	C825T	Alelo T associado com a hipertensão em homens	Hengstenberg e col., 2001
Itália (caucasianos)	461	Estudo de coorte	C825T	Alelo T associado com o aumento precoce da pressão arterial	Sartori e col., 2003
Japão	806	Caso-controle	C825T	Associação com a pressão de pulso e PAS	Yamamoto e col., 2004
China	1.004	Caso-controle	G-350A C825T C1429T	Alelo A do polimorfismo G-350A e haplótipo A-C-C associados à hipertensão	Li e col., 2005
Espanha (caucasianos)	144	Caso-controle	C825T	Associação do polimorfismo e a concentração plasmática de sódio e potássio	Martín e col., 2005
Polônia (homens)	44	Caso-controle	C825T	Alelo T e aumento da atividade do trocador sódio/hidrogênio aumentam o risco de hipertensão	Kedzierska e col., 2006
Coréia	1.612	Caso-controle	C825T	Interação entre alelo D do gene <i>ACE</i> e alelo 825T do <i>GNB3</i>	Bae e col., 2007
EUA (afro-descendentes e brancos)	14.716	Caso-controle	C825T	Interação entre polimorfismo, obesidade e atividade física como preditivos de hipertensão	Grove e col., 2007
Diversos países (populações asiáticas e caucasianas)	31.854	Meta-análise	C825T	Baixa frequência do alelo T em populações caucasianas que habitam em baixas latitudes	Bagos e col., 2007

1.5.4. O gene *NOS3*

Um gene muito investigado na hipertensão essencial é o *NOS3*, localizado no cromossomo 7 (em 7q36). Este gene se expressa constitutivamente nas células endoteliais vasculares e codifica uma enzima, a NO sintase endotelial (eNOS), que sintetiza o óxido nítrico. Miyamoto e col. (1998) identificaram um polimorfismo no exon 7, que consiste de uma substituição de um nucleotídeo G por um T na posição 824 no cDNA do gene, e que resulta em uma troca de um aminoácido glutamato por um aspartato na posição 298 da proteína (Glu298Asp - rs1799983). Alguns estudos sugeriram que o polimorfismo Glu298Asp está associado a doenças coronarianas e com a hipertensão essencial (Miyamoto e col., 1998; Shoji e col., 2000; Kajiyama e col., 2000). Li e col. (2004) constataram que um alelo raro no intron 4 deste gene, o qual é frequentemente encontrado em afro-descendentes, associado ao alelo G do polimorfismo encontrado no exon 7, poderia constituir um marcador das variações de pressão arterial em afro-americanos. Outros estudos, no entanto, não encontraram associação significativa do polimorfismo Glu298Asp com a ocorrência de hipertensão (Kato e col., 1999; Kishimoto e col., 2004, Zhao e col., 2006; Khawaja e col., 2007).

Zintzara e col., (2006) realizando uma meta-análise com diversos trabalhos publicados em relação ao gene *NOS3*, encontraram associação significativa entre um polimorfismo no intron 4 (a/b) em caucasianos, mas não em populações asiáticas e negras. Pereira e col. (2007), também em meta-análise, encontraram associação positiva entre o polimorfismo Glu298Asp e a hipertensão apenas em asiáticos, mas resultados negativos foram encontrados em relação ao polimorfismo no intron 4 (a/b), sugerindo-se que os resultados controversos entre os diversos estudos de associação entre polimorfismos no gene *NOS3* se devem ao fato de não serem considerados efeitos ambientais. Ambos os estudos sugerem que analisar haplótipos no gene *NOS3* podem trazer resultados mais elucidativos a respeito da genética da hipertensão do que avaliar cada polimorfismo individualmente.

A Tabela VI.1 resume alguns estudos de associação significativa entre o gene *NOS3* e a hipertensão em diversas populações.

Tabela VI.1: Estudos de associação com polimorfismos no gene *NOS3*.

País (população)	N	Desenho do estudo	Polimorfismo	Particularidades da associação encontrada	Referências
Japão	458	Caso-controle	Glu298Asp G10T intron4b/a A27C	Alelo Asp associado ao risco aumentado de hipertensão	Miyamoto e col., 1998
EUA (euro- descendentes)	439	Estudo transversal	Glu298Asp G23T	Alelo Glu associado ao risco aumentado de hipertensão	Lacolley e col., 1998
Japão	376	Caso-controle	Glu298Asp	associação com a hipertensão em homens e mulheres	Shoji e col., 2000
República Checa (caucasianos)	204	Caso-controle	Glu298Asp	Maior frequência do alelo T (Asp) no grupo de hipertensos resistentes à terapia anti-hipertensiva	Jáchymová e col., 2001
EUA	1148	Estudo de coorte	A-922G T-786C Glu298Asp G10T	Alelo Asp e 10T e haplótipo Glu/10T associados à pressão arterial em mulheres negras e brancas	Chen e col., 2004
Brasil (brancos) (negros)	225 178	Caso-controle	T-786C Glu298Asp intron4b/a	associação com hipertensão em brancos e negros	Sandrim e col., 2006
Brasil (população urbana miscigenada)	1577	Estudo transversal	Glu298Asp	Genótipo AspAsp aumenta o risco de hipertensão em indivíduos com colesterol elevado	Pereira e col., 2006
Diversos países e populações	31.539	Meta-análise	T-786C Glu298Asp intron4b/a G23T	Alelo 4b associado à diminuição dos risco de hipertensão em caucasianos	Zintzaras e col., 2006
Índia	910	Caso-controle	T-786C Glu298Asp intron4b/a	Haplótipos -786T/298Glu/4a e -786C/298Glu/4a considerados de risco	Kumar e col., 2009

1.5.5. O gene *ADD2*

Aducinas são proteínas heterodiméricas e atuam no citoesqueleto. Consistem de uma subunidade α e outra β ou γ . As três subunidades são codificadas por genes diferentes (*ADD1*, *ADD2* e *ADD3*, ou *Add1*, *Add2* e *Add3*, em humanos e ratos, respectivamente) mapeados em cromossomos distintos (Bianchi e col., 2005). As aducinas α e β estão abundantemente expressas nos eritrócitos, enquanto nos outros tecidos há maior expressão do heterodímero de aducinas α e γ (Richart e col., 2007).

Uma série de estudos conduzidos em ratos hipertensos (*Milan hypertensive strain*) e humanos indicou que a função alterada da aducina pode causar hipertensão por meio do aumento da reabsorção constitutiva de sódio pelos túbulos renais (Bianchi e col., 1994; Zagato e col., 2000; Tripodi e col., 2004). Num estudo *in vitro* em células de ratos normotensos e com a linhagem de ratos hipertensos *Milan*, Tripodi e col. (1996) descreveram a função das isoformas α e β da aducina na polimerização da actina do citoesqueleto e no transporte de íons pela membrana celular. Mutações no gene na subunidade β (*Add2*), isoladamente, não são capazes de gerar o fenótipo de hipertensão nos animais. Quando mutações da subunidade β são combinadas com mutações no gene da subunidade α (*Add1*), os níveis de pressão arterial são mais elevados do que aqueles observados em portadores de mutações somente na α - aducina. Nas células epiteliais renais transfectadas com a aducina mutada houve um aumento da atividade da bomba de Na^+/K^+ , dando apoio à hipótese de relação entre mutações nas aducinas, aumento da reabsorção de sódio nas células renais e a consequente hipertensão. Camundongos *knockout* deficientes de β - aducina apresentam maiores níveis de pressão arterial e de pulso (Marro e col., 2000).

Diversos achados bioquímicos, fisiológicos e moleculares apontam o gene *ADD2* (localizado no cromossomo 2, em 2p13 e que codifica β - aducina) como um candidato promissor para a susceptibilidade à hipertensão.

Nos estudos de associação em humanos, o polimorfismo C1797T (rs4984) no gene *ADD2* é o mais comumente investigado (Wang e col., 2002; Tikhonoff e col., 2003 a,b; Marcun Varda e col., 2006; Seidlerová e col., 2009).

Kato e col. (2008) realizaram um estudo de associação com alta densidade de marcadores do tipo SNP, em uma população japonesa, e encontraram associação altamente significativa entre outro polimorfismo no gene *ADD2* (A/C - rs3755351) e a hipertensão.

Poucos são os estudos de associação já publicados entre o gene *ADD2* e a hipertensão em humanos. A Tabela VII.1 resume alguns desses estudos.

Tabela VII.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene *ADD2*.

País (população)	N	Desenho do estudo	Polimorfismo	Particularidades da associação encontrada	Referências
Bélgica	1.848	Estudo transversal	C1797T	Alelo 1797T associado com risco aumentado de hipertensão em mulheres na pós-menopausa e usuárias de contraceptivos orais	Wang e col., 2002
Polônia Rússia Itália	844	Estudo transversal e baseado em famílias	C1797T	Alelo 1797T associado apenas com a PAS	Tikhnoff e col., 2003
Polônia Rússia Itália	844	Estudo transversal e baseado em famílias	C1797T	Frequência do alelo T difere entre as três populações	Tikhnoff e col., 2003b
EUA	1583	Estudo transversal	15 SNPs	Polimorfismos influenciam a resposta a certos medicamentos	Kardia e col., 2007
Japão	1.692	Caso-controle	A/C	Estudo caso-controle em larga escala, utilizando 80.795 SNPs distribuídos ao longo dos 22 autossomos	Kato e col., 2008

1.5.6. O gene *GRK4*

Os receptores do tipo quinase acoplados a proteínas G (GRKs) são da família de quinases serina/treonina, que têm papel na dessensibilização de outros receptores, como os receptores de dopamina do tipo I (D1). As GRKs estão envolvidas no desenvolvimento da hipertensão devido ao seu papel na ativação dos receptores D1, cuja ação reduz a reabsorção de sódio pelos túbulos renais.

O gene *GRK4* (da família dos GRKs), é expresso, entre outros tecidos, nos túbulos renais proximais. Polimorfismos no gene *GRK4*, localizado no cromossomo 4 (em 4p16), levam a alterações da função do GRK4, aumentando sua atividade e causando o desacoplamento dos receptores D1 do complexo enzimático ligado à proteína G que ativa esses receptores, não permitindo mais a excreção adequada de sódio pelos rins (Felder e col., 2002).

Bathnagar e col. (2009) estudaram a relação entre genótipos e haplótipos do gene *GRK4* e a relação com a variação da pressão arterial em afro-americanos que estavam sob tratamento medicamentoso com um bloqueador de β -adrenoreceptores. O polimorfismo A142V (rs1024323) estava associado à resposta da pressão arterial ao medicamento e os homens com o alelo A142 eram menos responsivos ao tratamento.

A expressão tecido- específica (Premont e col., 1996; Sallese e col., 1997) e o fato de estar ligado a um loco de susceptibilidade à hipertensão (Casari e col., 1995), torna o gene *GRK4* um atraente candidato a estar envolvido no mecanismo de patogênese da hipertensão essencial.

A Tabela VIII.1 resume alguns estudos de associação entre o gene *GRK4* e a hipertensão.

Tabela VIII.1: Estudos de associação com polimorfismos do gene *GRK4*.

País (população)	N	Desenho do estudo	Polimorfismo	Particularidades da associação encontrada	Referências
Itália	120	Caso-controle	R65L A142V A486V	Associação com a hipertensão sensível a sal	Bengra e col., 2002
Gana	177	Caso-controle	R65L A142V A486V	Análise por MDR sugerem interação entre polimorfismos R65L do <i>GRK4</i> e I/D do <i>ACE</i> na predisposição à hipertensão	Williams e col., 2004
Austrália (caucasianos)	480	Caso-controle	R65L A142V A486V	Alelo V associado à hipertensão e elevação da PAS. Alelos L65 e V142 com elevação da PAD em homens.	Speirs e col., 2004
EUA (gêmeos brancos e negros)	934	Análise de pares de irmãos	R65L A142V A486V	Alelo L65 e idade com interação significativa na variação da PAS, com efeito dose dependente	Zhu e col., 2006
China	993	Caso-controle	R65L A142V A486V	Polimorfismo A486V e haplótipos L-V-A e R-A-A associados à hipertensão	Wang e col., 2006
Japão	184	Caso-controle	R65L A142V A486V	Análise por MDR sugerem que polimorfismos do <i>GRK4</i> são preditivos de hipertensão sensível a sal	Sanada e col., 2006
EUA (afro-descendentes)	839	Estudo de coorte	R65L A142V A486V	Alelo V142 associado com resposta mais rápida ao metoprolol	Bathnagar e col., 2009

1.6. Os remanescentes de quilombos como modelo para estudo das bases genéticas da hipertensão essencial

A grande prevalência de hipertensão em populações afro-descendentes tem gerado especulações a respeito da possibilidade de existirem diferenças genéticas significativas que determinam susceptibilidade à hipertensão.

A alta diversidade genética das populações africanas e sua história demográfica as tornam particularmente informativas para se fazer mapeamentos genéticos de genes de doenças complexas como a hipertensão (Tishkoff & Williams, 2002).

Sabendo que houve uma grande contribuição africana na formação das populações brasileiras, consideramos de grande importância o estudo das bases genéticas relacionadas à hipertensão essencial nessas populações, especialmente nas populações remanescentes de quilombos.

Os remanescentes de quilombos são um modelo muito interessante para o estudo das doenças de herança multifatorial quando comparados aos estudos que são realizados com populações de hospitais dos grandes centros, heterogêneas do ponto de vista genético e sócio-ambiental. Os remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira são populações miscigenadas. Porém, os dados que obtivemos sobre diversos conjuntos de marcadores indicam que os componentes genéticos dessa mistura e suas proporções não diferem entre essas populações geograficamente muito próximas. Estudos de marcadores de cromossomo Y (Macedo-Souza, 2003; Kimura e col., 2010 – Anexo I), DNA mitocondrial (Rincon, 2009) e locos variáveis em diversos autossomos (alguns locos de PSA, *population specific alleles*) [Cotrim e col., 2004] foram alvos de pesquisas conduzidas pelo grupo. De acordo com o estudo de Tang e col. (2005), de um modo geral, populações geneticamente miscigenadas podem ser objeto de estudos caso-controle, sem artefatos significativos, desde que os indivíduos tenham a mesma origem geográfica, o que é o caso dos quilombos.

Os remanescentes de quilombos caracterizam-se como populações de ancestralidade majoritariamente africana e que vivem atualmente em áreas outrora ocupadas por escravos negros fugidos e/ou alforriados. Historicamente, quilombos eram “comunidades formada pelos negros escravos, que fugiram do trabalho forçado e resistiram à recaptura por parte das forças escravocratas” (Carvalho e col., 1995). O conceito de remanescente de quilombo mais aceito atualmente refere-se a “toda comunidade negra rural que agrupe descendentes de escravos vivendo da cultura de subsistência e onde as manifestações culturais têm forte vínculo com o passado” (Oliveira Jr e col., 2000), incluindo não somente negros fugidos, mas também os libertos ou abandonados por seus senhores.

Remanescentes de quilombos no Vale do Ribeira

A ocupação do Vale do Ribeira remonta ao período pré-colombiano. A presença de inúmeros sítios arqueológicos comprova que a ocupação humana no Vale do Ribeira é anterior à chegada dos portugueses. O Vale era utilizado como rota de passagem dos ameríndios vindos do planalto para o litoral. No século XVI, as bandeiras de mineração iniciaram suas expedições partindo do litoral sul de São Paulo para o interior do Vale do Ribeira, estabelecendo os primeiros povoados na região. A mineração do ouro representou o primeiro ciclo econômico do Vale. Durante o século XVII, muitos africanos foram trazidos para a região como mão de obra ligada à mineração. Com o fim do ciclo da mineração, os escravos negros eram abandonados pelos senhores, e juntamente com aqueles que fugiam, formaram os quilombos (Oliveira Jr e col., 2000).

Em 1576 foi fundada uma das primeiras cidades, Iporanga. No século XVII, em função do ouro encontrado às margens do rio Ribeira do Iguape, teve origem a cidade de Xiririca, hoje Eldorado (Agenda socioambiental – ISA, 2008).

O Vale do Ribeira está localizado em dois dos estados mais desenvolvidos do país, abrangendo o sudeste de São Paulo e leste do Paraná (Figura 4.1). A área da Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira do Iguape e Complexo Estuarino Lagunar de Iguape-Cananéia-Paranguá, genericamente chamada de Vale do Ribeira, abrange 31 municípios – 9 no Paraná e 22 em São Paulo. Mais dez municípios paranaenses e 14 paulistas estão ainda parcialmente inseridos. O Vale do Ribeira caracteriza-se por ter sido uma das primeiras regiões brasileiras mais intensamente exploradas. Mesmo assim, ainda abriga o maior remanescente de Mata Atlântica do país. Dos 7% que restaram desse bioma no Brasil, 21% estão no Vale do Ribeira (Agenda Socioambiental - ISA, 2008). O relevo é predominantemente montanhoso, o clima é quente e úmido. O Vale do Ribeira ocupa 10% do território do Estado de São Paulo. Cerca de 60% de sua área é protegida por leis ambientais que estabelecem restrições ao uso e 20% do território do Vale abriga parques, estações ecológicas e outras áreas de proteção ambiental (Oliveira Jr e col., 2000).

Em 1999 foi considerado pela Unesco (Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e a Cultura) como Patrimônio Natural da Humanidade.

O Vale do Ribeira é a região do estado de São Paulo onde se encontra a maior parte dos remanescentes de quilombos do estado (Figura 4.1). De acordo com dados oficiais do ITESP (Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo), juntamente com os dados do EAACONE (Equipe de Articulações e Assessoria às Comunidades Negras do Vale do Ribeira), existem 59 comunidades quilombolas na porção paulista do Vale do Ribeira.

Foram reconhecidas pelo ITESP, até o momento, 26 comunidades nessa região: **Ivaporunduva, Maria Rosa, Pedro Cubas, Pilões, São Pedro, Cafundó, Caçandoca, Jaó,**

Sapatu, Nhunguara, André Lopes, Galvão, Mandira, Praia Grande, Porto Velho, Pedro Cubas de Cima, Capivari, Brotas, Cangume, Camburi, Morro Seco, **Poça**, Cedro, Ribeirão Grande/Terra Seca, **Reginaldo** e Pedra Preta/Paraíso. Apenas seis têm as terras tituladas: Ivaporunduva, Maria Rosa, Pedro Cubas, Pilões, São Pedro e Galvão. Cinco estão em fase de reconhecimento: Biguazinho, Bombas, Fazenda da Caixa, Fazendinha Pilar e Cazanga. Outras quinze comunidades foram apontadas pelo ITESP para reconhecimento: Os Camargo, Fazendinha dos Pretos, Carmo, **Abobral**, Castelhanos, Bananal Pequeno, Chácara dos Pretos, Jaú, Tamandaré, Bairro Peropava, Poço Grande, Anta Magra, Tocos, Piraporinha/Jucurupava/Itinga e Piririca.

As Figuras 5.1 a 8.1 ilustram alguns cenários típicos do Vale do Ribeira e algumas comunidades que foram estudadas no presente trabalho.

Atualmente, essas populações sobrevivem às margens dos últimos remanescentes de Mata Atlântica da Região Sudeste do Brasil. Seu modo de vida, tradicionalmente rural, encontra-se em transformação, pois as leis ambientais dificultam sua agricultura de subsistência, a caça e a manutenção de certos animais. Podemos afirmar que os remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira são populações que vivem a transição epidemiológica, sendo afetados simultaneamente por doenças resultantes da sua falta de acesso a serviços básicos de saneamento e saúde (como por exemplo, as doenças parasitárias) e por doenças frequentes do mundo ocidental e moderno, como a hipertensão e a obesidade.

Figura 4.1: Mapas dos estados de São Paulo e Paraná. Em verde, localização geográfica do Vale do Ribeira. O quadrado azul corresponde à área onde se concentram as comunidades remanescentes de quilombos por nós estudadas. Fonte: ISA – Instituto Socioambiental.

Figura 5.1: Vista panorâmica do Vale do Ribeira na comunidade de Abobral. Fonte: arquivo do Laboratório de Genética Humana.

Figura 6.1: Travessia por meio de balsa que dá acesso às comunidades de Pilões e Maria Rosa. Fonte: arquivo do Laboratório de Genética Humana.

Figura 7.1: Detalhe da balsa que dá acesso à comunidade de Pedro Cubas – cabo de aço que traciona a balsa, que se movimenta apenas pela força da correnteza do rio Ribeira. À direita, detalhe do caminho de acesso à comunidade de São Pedro, sem qualquer pavimentação. Fonte: arquivo pessoal de Israel Rubio.

Figura 8.1: Casas características das comunidades remanescentes de quilombos – comunidade de Reginaldo. Fonte: arquivo pessoal.

CAPÍTULO 2

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Nossa pesquisa teve como objetivo geral estudar fatores de risco genético associados à hipertensão essencial em populações afro-descendentes, de remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira – SP.

2.2. Objetivos específicos

Para atender o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram cumpridos:

1. Determinação dos genótipos em polimorfismos em genes candidatos a explicar o fenótipo da hipertensão: *ACE*, *AGT*, *GNB3*, *NOS3*, *ADD2* e *GRK4*;
2. Determinação dos genótipos em polimorfismos do tipo INDEL (inserção/deleção), selecionados por serem eficazes na realização de estimativas de ancestralidade genômica;
3. Análise de aspectos do processo de miscigenação que ocorreu nessas populações;
4. Estudos de controle de ancestralidade nos grupos hipertensos e normotensos, com o objetivo de verificar a ocorrência de estratificação populacional em nossas amostras;
5. Análises de associação dos genótipos determinados em genes candidatos com o fenótipo da hipertensão, por meio de estudo transversal;
6. Estudos de transmissão dos genótipos nos genes candidatos nas famílias, utilizando estratégias que analisam genealogias com estrutura heterogênea.

REFERÊNCIAS

- Abe-Sandes K, Silva WA Jr, Zago MA. Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. *Hum Biol.* 2004 Feb; 76(1):77-86. Review.
- Adeyemo A, Gerry N, Chen G, Herbert A, Doumatey A, Huang H, Zhou J, Lashley K, Chen Y, Christman M, Rotimi C. A genome-wide association study of hypertension and blood pressure in African Americans. *PLoS Genet.* 2009 Jul; 5(7):e1000564.
- Addo J, Smeeth L, Leon DA. Hypertension in sub-saharan Africa: a systematic review. *Hypertension.* 2007 Dec; 50(6):1012-8. Review.
- Agenda socioambiental de comunidades quilombolas do Vale do Ribeira / editores: Kátia M. Pacheco dos Santos, Nílto Tatto. Instituto Socioambiental, 2008.
- Agyemang C, Bhopal R. Is the blood pressure of people from African origin adults in the UK higher or lower than that in European origin white people? A review of cross-sectional data. *J Hum Hypertens.* 2003 Aug; 17(8):523-34. Review.
- Akey J, Jin L, Xiong M. Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? *Eur J Hum Genet.* 2001 Apr; 9(4):291-300.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000 Aug; 67(2):444-61. Erratum in: *Am J Hum Genet* 2000 Sep; 67(3):775.
- Angeli, CB. Susceptibilidade Genética e Outros Fatores de Risco Associados ao Sobrepeso e à Obesidade em Populações Afro-descendentes do Vale do Ribeira-SP. Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, 2008.
- Arora P, Newton-Cheh C. Blood pressure and human genetic variation in the general population. *Curr Opin Cardiol.* 2010 Mar 10.
- Arpini-Sampaio Z, Costa MC, Melo AA, Carvalho MF, Deus MS, Simões AL. Genetic polymorphisms and ethnic admixture in African-derived black communities of northeastern Brazil. *Hum Biol.* 1999 Feb; 71(1):69-85.
- Bae Y, Park C, Han J, Hong YJ, Song HH, Shin ES, Lee JE, Han BG, Jang Y, Shin DJ, Yoon SK. Interaction between GNB3 C825T and ACE I/D polymorphisms in essential hypertension in Koreans. *J Hum Hypertens.* 2007 Feb; 21(2):159-66.
- Bagos PG, Elefsinioti AL, Nikolopoulos GK, Hamodrakas SJ. The GNB3 C825T polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis of 34 studies including 14,094 cases and 17,760 controls. *J Hypertens.* 2007 Mar; 25(3):487-500.
- Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med.* 2008 Jun; 86(6):615-21.
- Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010; 50:439-65. Review.
- Baker M, Rahman T, Hall D, Avery PJ, Mayosi BM, Connell JM, Farrall M, Watkins H, Keavney B. The C-532T polymorphism of the angiotensinogen gene is associated

- with pulse pressure: a possible explanation for heterogeneity in genetic association studies of AGT and hypertension. *Int J Epidemiol.* 2007 Dec; 36(6):1356-62.
- Bamshad MJ, Wooding S, Watkins WS, Ostler CT, Batzer MA, Jorde LB. Human population genetic structure and inference of group membership. *Am J Hum Genet.* 2003 Mar; 72(3):578-89.
- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet.* 2006 Sep; 70(Pt 5):658-65.
- Bengra C, Mifflin TE, Khripin Y, Manunta P, Williams SM, Jose PA, Felder RA. Genotyping of essential hypertension single-nucleotide polymorphisms by a homogeneous PCR method with universal energy transfer primers. *Clin Chem.* 2002 Dec; 48(12):2131-40.
- Bhatnagar V, O'Connor DT, Brophy VH, Schork NJ, Richard E, Salem RM, Nievergelt CM, Bakris GL, Middleton JP, Norris KC, Wright J, Hiremath L, Contreras G, Appel LJ, Lipkowitz MS; AASK Study Investigators. G-protein-coupled receptor kinase 4 polymorphisms and blood pressure response to metoprolol among African Americans: sex-specificity and interactions. *Am J Hypertens.* 2009 Mar; 22(3):332-8.
- Bianchi G, Tripodi G, Casari G, Salardi S, Barber BR, Garcia R, Leoni P, Torielli L, Cusi D, Ferrandi M, et al. Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 26; 91(9):3999-4003.
- Bianchi G, Ferrari P, Staessen JA. Adducin polymorphism: detection and impact on hypertension and related disorders. *Hypertension.* 2005 Mar; 45(3):331-40. Review.
- Binder A. A review of the genetics of essential hypertension. *Curr Opin Cardiol.* 2007 May; 22(3):176-84. Review.
- Bis JC, Smith NL, Psaty BM, Heckbert SR, Edwards KL, Lemaitre RN, Lumley T, Rosendaal FR. Angiotensinogen. Met235Thr polymorphism, angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy, and the risk of nonfatal stroke or myocardial infarction in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2003 Dec; 16(12):1011-7.
- Boehnke M, Langefeld CD. Genetic association mapping based on discordant sib pairs: the discordant-alleles test. *Am J Hum Genet.* 1998 Apr; 62(4):950-61.
- Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE, Hoggart CL, McKeigue PM, Shriver MD. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet.* 2004 Mar; 68(Pt 2):139-53.
- Bortolini MC, Zago MA, Salzano FM, Silva-Júnior WA, Bonatto SL, da Silva MC, Weimer TA. Evolutionary and anthropological implications of mitochondrial DNA variation in African Brazilian populations. *Hum Biol.* 1997 Apr; 69(2):141-59.
- Bortolini MC, Da Silva WA Junior WA, De Guerra DC, Remonato G, Mirandola R, Hutz MH, Weimer TA, Silva MC, Zago MA, Salzano FM. African-derived South American populations: A history of symmetrical and asymmetrical matings

- according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. *Am J Hum Biol.* 1999; 11(4):551-563.
- Bourne LT, Lambert EV, Steyn K. Where does the black population of South Africa stand on the nutrition transition? *Public Health Nutr.* 2002 Feb; 5(1A):157-62. Review.
- Brand E, Chatelain N, Keavney B, Caulfield M, Citterio L, Connell J, Grobbee D, Schmidt S, Schunkert H, Schuster H, Sharma AM, Soubrier F. Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension: a European study. *Hypertension.* 1998 Mar; 31(3):725-9.
- Brand E, Herrmann SM, Nicaud V, Ruidavets JB, Evans A, Arveiler D, Luc G, Plouin PF, Tiret L, Cambien F. The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit beta3 is not related to hypertension. *Hypertension.* 1999 May; 33(5):1175-8.
- Callegari-Jacques SM, Salzano FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. *Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v. 51, p. 166-174, 1999.
- Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet.* 2003 Feb 15; 361(9357):598-604. Review.
- Casari G, Barlassina C, Cusi D, Zagato L, Muirhead R, Righetti M, Nembri P, Amar K, Gatti M, Macciardi F, et al. Association of the alpha-adducin locus with essential hypertension. *Hypertension.* 1995 Mar; 25(3):320-6.
- Carey RM. Aldosterone and cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010 Jun;17(3):194-8. Review.
- Carvalho JJ, SJ Doria, ANJ Oliveira – histórias, tradição e lutas. EDUFBA, Salvador, 1995.
- Carvalho BM, Bortolini MC, Batista dos Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AKC. Mitochondrial DNA mapping of social-biological interactions in Brazilian Amazonian African-descendant populations. *Genet Mol Biol.* vol 31, n.1 São Paulo, 2008.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet.* 2001 Jan; 68(1):281-6.
- Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Farrall M, Kamdar S, Daniel H, Lawson M, De Freitas P, Fogarty P, Clark AJ. Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. *J Clin Invest.* 1995 Aug; 96(2):687-92.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. *The History and Geography of Human Genes.* Princeton University Press, USA, 1996.
- Cavalli-Sforza LL. The DNA revolution in population genetics. *Trends Genet.* 1998 Feb; 14(2):60-5. Review.
- Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nat Genet.* 2003 Mar; 33 Suppl:266-75. Review.

- Cayres-Vallinoto IMV, Vallinoto ACR, Valente CMD, Guerreiro JF. Allele frequency distributions of six hypervariable loci (D1S80, APOB, D4S43, vW1, F13A and DYS19) in two African-Brazilian communities from the Amazon region. *Genet Mol Biol*, vol.26 n.3 São Paulo, 2003.
- Chen W, Srinivasan SR, Li S, Boerwinkle E, Berenson GS. Gender-specific influence of NO synthase gene on blood pressure since childhood: the Bogalusa Heart Study. *Hypertension*. 2004 Nov; 44(5):668-73.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003 Dec; 42(6):1206-52.
- Chuang SY, Chou P, Hsu PF, Cheng HM, Tsai ST, Lin IF, Chen CH. Presence and progression of abdominal obesity are predictors of future high blood pressure and hypertension. *Am J Hypertens*. 2006 Aug; 19(8):788-95.
- Citterio L, Lanzani C, Manunta P, Bianchi G. Genetics of primary hypertension: The clinical impact of adducin polymorphisms. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Apr 8.
- Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol*. 2005 Jul; 186(1):1-20. Review.
- Cooper R, Rotimi C. Hypertension in blacks. *Am J Hypertens*. 1997 Jul; 10(7 Pt 1):804-12. Review.
- Cooper RS, Rotimi CN, Ward R. The puzzle of hypertension in African-Americans. *Sci Am*. 1999 Feb; 280(2):56-63.
- Cooper RS, Wolf-Maier K, Luke A, Adeyemo A, Banegas JR, Forrester T, Giampaoli S, Joffres M, Kasterinen M, Primatesta P, Stegmayr B, Thamm M. An international comparative study of blood pressure in populations of European vs. African descent. *BMC Med*. 2005 Jan 5; 3:2.
- Cotrim NH, Auricchio MT, Vicente JP, Otto PA, Mingroni-Netto RC. Polymorphic Alu insertions in six Brazilian African-derived populations. *Am J Hum Biol*. 2004 May-Jun; 16(3):264-77.
- Crawford AG, Cote C, Couto J, Daskiran M, Gunnarsson C, Haas K, Haas S, Nigam SC, Schuette R. Prevalence of obesity, type II diabetes mellitus, hyperlipidemia, and hypertension in the United States: findings from the GE Centricity Electronic Medical Record database. *Popul Health Manag*. 2010 Jun; 13(3):151-61.
- Cui J, Zhou X, Chazaro I, DeStefano AL, Manolis AJ, Baldwin CT, Gavras H. Association of polymorphisms in the promoter region of the PNMT gene with essential hypertension in African Americans but not in whites. *Am J Hypertens*. 2003 Oct; 16(10):859-63.

- Da Silva WA Jr, Bortolini MC, Meyer D, Salzano FM, Elion J, Krishnamoorthy R, Schneider MP, De Guerra DC, Layrisse Z, Castellano HM, Weimer TD, Zago MA. Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determined on the basis of six hypervariable loci. *Am J Phys Anthropol.* 1999 Aug; 109(4):425-37.
- De Mello Auricchio MT, Vicente JP, Meyer D, Mingroni-Netto RC. Frequency and origins of hemoglobin S mutation in African-derived Brazilian populations. *Hum Biol.* 2007 Dec; 79(6):667-77.
- Deshmukh PR, Gupta SS, Dongre AR, Bharambe MS, Maliye C, Kaur S, Garg BS. Relationship of anthropometric indicators with blood pressure levels in rural Wardha. *Indian J Med Res.* 2006 May; 123(5):657-64.
- de Oliveira CM, Pereira AC, de Andrade M, Soler JM, Krieger JE. Heritability of cardiovascular risk factors in a Brazilian population: Baependi Heart Study. *BMC Med Genet.* 2008 Apr 22; 9:32.
- Dornelles CL, Callegari-Jacques, SM, Robinson WM, Weimer TA, Franco MHLP, Hickmann, Geiger CJ, Salzano FM. Genetics, surnames, grandparents nationalities, and ethnic admixture in Southern Brazil: do the parents of variation coincide? *Genet Mol Biol.* vol 22, n.2 São Paulo, June 1999.
- Di Pasquale P, Cannizzaro S, Paterna S. Does angiotensin-converting enzyme gene polymorphism affect blood pressure? Findings after 6 years of follow-up in healthy subjects. (2004). *Eur J Heart Fail.* Jan;6(1):11-6.
- VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*, São Paulo, v.17, n.1. Jan/Mar 2010. Sociedade Brasileira de Cardiologia.
- Dong Y, Zhu H, Sagnella GA, Carter ND, Cook DG, Cappuccio FP. Association between the C825T polymorphism of the G protein beta3-subunit gene and hypertension in blacks. *Hypertension.* 1999 Dec; 34(6):1193-6.
- Ehret GB. Genome-wide association studies: contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2010 Feb; 12(1):17-25. Review.
- Ekpo EB, Udofia O, Eshiet NF, Andy JJ. Demographic, life style and anthropometric correlates of blood pressure of Nigerian urban civil servants, factory and plantation workers. *J Hum Hypertens.* 1992 Aug;6(4):275-80.
- Enoch MA, Shen PH, Xu K, Hodgkinson C, Goldman D. Using ancestry-informative markers to define populations and detect population stratification. *J Psychopharmacol.* 2006 Jul; 20(4 Suppl):19-26. Review.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online.* 2005; 1:47-50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics.* 2003 Aug; 164(4):1567-87.

- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes*. 2007 Jul 1; 7(4):574-578.
- Fejerman L, Wu X, Adeyemo A, Luke A, Zhu X, Hicks C, Cooper RS. The effect of genetic variation in angiotensinogen on serum levels and blood pressure: a comparison of Nigerians and US blacks. *J Hum Hypertens*. 2006 Nov; 20(11):882-7.
- Felder RA, Sanada H, Xu J, Yu PY, Wang Z, Watanabe H, Asico LD, Wang W, Zheng S, Yamaguchi I, Williams SM, Gainer J, Brown NJ, Hazen-Martin D, Wong LJ, Robillard JE, Carey RM, Eisner GM, Jose PA. G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19; 99(6):3872-7.
- 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. *Circulation*. 1998 May 12; 97(18):1773-9.
- Foucan L, Hanley J, Deloumeaux J, Suissa S. Body mass index (BMI) and waist circumference (WC) as screening tools for cardiovascular risk factors in Guadeloupean women. *J Clin Epidemiol*. 2002 Oct; 55(10):990-6.
- Funder JW. Aldosterone and mineralocorticoid receptors in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010 Mar-Apr; 52(5):393-400. Review.
- Frisancho RA. Anthropometric Standards for the Assessment of Growth and Nutritional Status. 1990. The University of Michigan Press, USA.
- Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. 2009. World Health Organization.
- González JR, Carrasco JL, Dudbridge F, Armengol L, Estivill X, Moreno V. Maximizing association statistics over genetic models. *Genet Epidemiol*. 2008 Apr; 32(3):246-54.
- Guerreiro JF, Ribeiro-dos-Santos AKC, Santos EJM, Vallinoto ACR, Cayres-Vallinoto IMV, Aguiar GFS, Batista dos Santos SE. Genetical-Demographic Data From Two Amazonian Populations Composed of Descendants of African Slaves: Pacoval and Curiau. *Genet Mol Biol*. vol.22, n.2 São Paulo, June 1999.
- Gu D, Su S, Ge D, Chen S, Huang J, Li B, Chen R, Qiang B. Association study with 33 single-nucleotide polymorphisms in 11 candidate genes for hypertension in Chinese. *Hypertension*. 2006 Jun; 47(6):1147-54.
- Guo SW, Thompson EA. Biometrics. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. 1992 Jun; 48(2):361-72.
- Gus M, Cichelero FT, Moreira CM, Escobar GF, Moreira LB, Wiehe M, Fuchs SC, Fuchs FD. Waist circumference cut-off values to predict the incidence of hypertension: an estimation from a Brazilian population-based cohort. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009 Jan; 19(1):15-9.

- Guzmán B, Cormand B, Ribasés M, González-Núñez D, Botey A, Poch E. Implication of chromosome 18 in hypertension by sibling pair and association analyses: putative involvement of the RKHD2 gene. *Hypertension*. 2006 Nov; 48(5):883-91.
- Grove ML, Morrison A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hoelscher DM, Bray MS. Gene-environment interaction and the GNB3 gene in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Int J Obes (Lond)*. 2007 Jun; 31(6):919-26.
- Harrap SB. Blood pressure genetics: time to focus. *J Am Soc Hypertens*. 2009 Jul-Aug;3(4):231-7.
- Hengstenberg C, Schunkert H, Mayer B, Döring A, Lowel H, Hense HW, Fischer M, Riegger GA, Holmer SR, Higaki. Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene (GNB3) with arterial hypertension but not with myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2001 Mar; 49(4):820-7.
- Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations. *Eur J Hum Genet*. 2001 Apr; 9(4):301-6.
- Huang X, Ju Z, Song Y, Zhang H, Sun K, Lu H, Yang Z, Jose PA, Zhou G, Wang M, Wang W, Feng S, Hui R. Lack of association between the G protein beta3 subunit gene and essential hypertension in Chinese: a case-control and a family-based study. *J Mol Med*. 2003 Nov; 81(11):729-35.
- International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, Pasternak S, Wheeler DA, Willis TD, Yu F, Yang H, Zeng C, Gao Y, Hu H, Hu W, Li C, Lin W, Liu S, Pan H, Tang X, Wang J, Wang W, Yu J, Zhang B, Zhang Q, Zhao H, Zhao H, Zhou J, Gabriel SB, Barry R, Blumenstiel B, Camargo A, Defelice M, Faggart M, Goyette M, Gupta S, Moore J, Nguyen H, Onofrio RC, Parkin M, Roy J, Stahl E, Winchester E, Ziaugra L, Altshuler D, Shen Y, Yao Z, Huang W, Chu X, He Y, Jin L, Liu Y, Shen Y, Sun W, Wang H, Wang Y, Wang Y, Xiong X, Xu L, Waye MM, Tsui SK, Xue H, Wong JT, Galver LM, Fan JB, Gunderson K, Murray SS, Oliphant AR, Chee MS, Montpetit A, Chagnon F, Ferretti V, Leboeuf M, Olivier JF, Phillips MS, Roumy S, Sallée C, Verner A, Hudson TJ, Kwok PY, Cai D, Koboldt DC, Miller RD, Pawlikowska L, Taillon-Miller P, Xiao M, Tsui LC, Mak W, Song YQ, Tam PK, Nakamura Y, Kawaguchi T, Kitamoto T, Morizono T, Nagashima A, Ohnishi Y, Sekine A, Tanaka T, Tsunoda T, Deloukas P, Bird CP, Delgado M, Dermitzakis ET, Gwilliam R, Hunt S, Morrison J, Powell D, Stranger BE, Whittaker P, Bentley DR, Daly MJ, de Bakker PI, Barrett J, Chretien YR, Maller J, McCarroll S, Patterson N, Pe'er I, Price A, Purcell S, Richter DJ, Sabeti P, Saxena R, Schaffner SF, Sham PC, Varilly P, Altshuler D, Stein LD, Krishnan L, Smith AV, Tello-Ruiz MK, Thorisson GA, Chakravarti A, Chen PE, Cutler DJ, Kashuk CS, Lin S, Abecasis GR, Guan W, Li Y, Munro HM, Qin ZS, Thomas DJ, McVean G, Auton A, Bottolo L, Cardin N, Eyheramendy S, Freeman C, Marchini J, Myers S, Spencer C, Stephens M, Donnelly P, Cardon LR, Clarke G, Evans DM, Morris AP, Weir BS, Tsunoda T, Mullikin JC, Sherry ST, Feolo M, Skol A, Zhang H, Zeng C, Zhao H, Matsuda I, Fukushima Y, Macer DR, Suda E, Rotimi CN, Adebamowo CA, Ajayi I, Aniagwu T, Marshall PA, Nkwodimmah C, Royal CD, Leppert MF, Dixon M, Peiffer A, Qiu R, Kent A, Kato K, Niiikawa N, Adewole IF, Knoppers BM, Foster MW, Clayton EW, Watkin J, Gibbs RA, Belmont JW, Muzny D,

- Nazareth L, Sodergren E, Weinstock GM, Wheeler DA, Yakub I, Gabriel SB, Onofrio RC, Richter DJ, Ziaugra L, Birren BW, Daly MJ, Altshuler D, Wilson RK, Fulton LL, Rogers J, Burton J, Carter NP, Clee CM, Griffiths M, Jones MC, McLay K, Plumb RW, Ross MT, Sims SK, Willey DL, Chen Z, Han H, Kang L, Godbout M, Wallenburg JC, L'Archevêque P, Bellemare G, Saeki K, Wang H, An D, Fu H, Li Q, Wang Z, Wang R, Holden AL, Brooks LD, McEwen JE, Guyer MS, Wang VO, Peterson JL, Shi M, Spiegel J, Sung LM, Zacharia LF, Collins FS, Kennedy K, Jamieson R, Stewart J. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):851-61.
- Ismail M, Akhtar N, Nasir M, Firasat S, Ayub Q, Khaliq S. Association between the angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and essential hypertension in young Pakistani patients. *J Biochem Mol Biol*. 2004 Sep 30; 37(5):552-5.
- Jáchymová M, Horký K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, Martásek P. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jun 8; 284(2):426-30.
- Jain S, Tang X, Narayanan CS, Agarwal Y, Peterson SM, Brown CD, Ott J, Kumar A. Angiotensinogen gene polymorphism at -217 affects basal promoter activity and is associated with hypertension in African-Americans. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36889-96.
- Jardim PC, Carneiro O, Carneiro SB, Baiocchi MN. [Arterial blood pressure in the remaining isolated black community of a quilombo north of Goiás-Kalunga]. *Arq Bras Cardiol*. 1992 Apr; 58(4):289-93.
- Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M, Sharma AM, Gimenez-Roqueplo AP, Hata A, Corvol P, Lalouel JM. Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. *Am J Hum Genet*. 1997 Jun; 60(6):1448-60.
- Ji LD, Zhang LN, Shen P, Wang P, Zhang YM, Xing WH, Xu J. 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 Mar; 28(3): 419-28.
- Jiang S, Hsu YH, Niu T, Xu X, Xing H, Chen C, Wang X, Zhang Y, Peng S, Xu X. A common haplotype on methylenetetrahydrofolate reductase gene modifies the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on blood pressure in essential hypertension patients--a family-based association study. *Clin Exp Hypertens*. 2005 Aug;27(6):509-21.
- Johnson AD, O'Donnell CJ. An open access database of genome-wide association results. *BMC Med Genet*. 2009 Jan 22; 10:6.
- Jose PA, Soares-da-Silva P, Eisner GM, Felder RA. Dopamine and G protein-coupled receptor kinase 4 in the kidney: Role in blood pressure regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Feb 12.

- Ju Z, Zhang H, Sun K, Song Y, Lu H, Hui R, Huang X. Alpha-adducin gene polymorphism is associated with essential hypertension in Chinese: a case-control and family-based study. *J Hypertens*. 2003 Oct; 21(10):1861-8.
- Kajiyama N, Saito Y, Miyamoto Y, Yoshimura M, Nakayama M, Harada M, Kuwahara K, Kishimoto I, Yasue H, Nakao K. Lack of association between T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and essential hypertension. *Hypertens Res*. 2000 Nov; 23(6): 561-5.
- Kardia SL, Sun YV, Hamon SC, Barkley RA, Boerwinkle E, Turner ST. Interactions between the adducin 2 gene and antihypertensive drug therapies in determining blood pressure in people with hypertension. *BMC Med Genet*. 2007 Sep 13; 8:61.
- Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension*. 1999 Apr; 33(4):933-6.
- Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Yanai K, Hanada H, Kamide K, Nakura J, Kohara K, Takeuchi F, Mano H, Yasunami M, Kimura A, Kita Y, Ueshima H, Nakayama T, Soma M, Hata A, Fujioka A, Kawano Y, Nakao K, Sekine A, Yoshida T, Nakamura Y, Saruta T, Ogiwara T, Sugano S, Miki T, Tomoike H. High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project. *Hum Mol Genet*. 2008 Feb 15; 17(4):617-27.
- Kedzierska K, Ciechanowski K, Safranow K, Bober J, Golembiewska E, Kwiatkowska E, Kabat-Koperska J, Ostrowski M, Adler G, Chlubek D. GNB3 C825T and ACE I/D polymorphisms on the sodium-proton exchanger and the prevalence of essential hypertension in males. *Arch Med Res*. 2006 Jan; 37(1):150-7.
- Kendrew J (ed) *The Encyclopedia of Molecular Biology*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 1994.
- Kengne AP, Awah PK, Fezeu L, Mbanya JC. The burden of high blood pressure and related risk factors in urban sub-Saharan Africa: evidences from Douala in Cameroon. *Afr Health Sci*. 2007 Mar;7(1):38-44.
- Khawaja MR, Taj F, Ahmad U, Saleheen D, Jafar T, Frossard PM. Association of endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism with essential hypertension in an adult Pakistani Pathan population. *Int J Cardiol*. 2007 Mar 2; 116(1):113-5.
- Kishimoto T, Misawa Y, Kaetu A, Nagai M, Osaki Y, Okamoto M, Yoshida S, Kurosawa Y, Fukumoto S. eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese. *Prev Med*. 2004 Nov; 39(5):927-31.
- Kimura, I; Macedo-Souza, LI; Rincon, D; Vicente, JP, Auricchio, MTBM, Otto, PA; Mingroni-Netto, RC. Origin and Diversity of Y Chromosome in African-derived Brazilian Populations. Manuscript submetido ao American Journal of Human Biology. 2010.
- Klein HS. *The Atlantic Slave Trade*. Cambridge University Press, 1999.

- Knapp M. A note on power approximations for the transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet.* 1999 Apr; 64(4):1177-85.
- Kosoy R, Nassir R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, Kittles R, Alarcon-Riquelme ME, Gregersen PK, Belmont JW, De La Vega FM, Seldin MF. Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Hum Mutat.* 2009 Jan; 30(1):69-78.
- Kumar A, Li Y, Patil S, Jain S. A haplotype of the angiotensinogen gene is associated with hypertension in african americans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005 May-Jun; 32(5-6):495-502. Review.
- Kumar R, Nejatizadeh A, Arif E, Akhtar S, Gupta M, Tyagi S, Goyal AK, Jain SK, Qadar Pasha MA. Multi-locus interactions of vascular homeostasis genes in essential hypertension: a gender-based study. *Clin Chim Acta.* 2009 Jul; 405(1-2):87-93.
- Lacolley P, Gautier S, Poirier O, Pannier B, Cambien F, Benetos A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens.* 1998 Jan; 16(1):31-5.
- Lafferty AR, Torpy DJ, Stowasser M, Taymans SE, Lin JP, Huggard P, Gordon RD, Stratakis CA. A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22). *J Med Genet.* 2000 Nov; 37(11):831-5.
- Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol.* 2000; 19 Suppl 1:S36-42.
- Laird NM, Lange C. Family-based designs in the age of large-scale gene-association studies. *Nat Rev Genet.* 2006 May; 7(5):385-94. Review.
- Larson N, Hutchinson R, Boerwinkle E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension.* 2000 Jun; 35(6):1297-300.
- Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A; International Society of Hypertension. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet.* 2008 May 3; 371(9623):1513-8. Review.
- Lazzeroni LC, Lange K. A conditional inference framework for extending the transmission/disequilibrium test. *Hum Hered.* 1998 Mar-Apr; 48(2):67-81.
- Lee ZS, Critchley JA, Chan JC, Anderson PJ, Thomas GN, Ko GT, Young RP, Chan TY, Cockram CS, Tomlinson B. Obesity is the key determinant of cardiovascular risk factors in the Hong Kong Chinese population: cross-sectional clinic-based study. *Hong Kong Med J.* 2000 Mar; 6(1):13-23.
- Lessa I. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. *Rev Bras Hipertens* 8: 383-92, 2001.
- Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igbo-Pemu P, Lankford B, Morgan J, Nkemdechi S, Liu G, Pack C, Silvestrov N, von Deutsch DA, Song Q, Abukhalaf IK, Ofili E. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level,

- endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens*. 2004 Jul; 17(7):560-7.
- Li B, Ge D, Wang Y, Zhao W, Zhou X, Gu D, Chen R. G protein beta 3 subunit gene variants and essential hypertension in the northern Chinese Han population. *Ann Hum Genet*. 2005 Jul; 69(Pt 4):468-73.
- Li WW, Niu WQ, Zhang Y, Wu S, Gao PJ, Zhu DL. Family-based analysis of apelin and AGTRL1 gene polymorphisms with hypertension in Han Chinese. *J Hypertens*. 2009 Jun; 27(6):1194-201.
- Luizon MR, Mendes-Junior CT, De Oliveira SF, Simões AL. Ancestry informative markers in Amerindians from Brazilian Amazon. *Am J Hum Biol*. 2008 Jan-Feb; 20(1):86-90.
- Macedo-Souza LI. Variabilidade Molecular do Cromossomo Y em Remanescentes de Quilombos do Vale do Ribeira. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, 2003.
- Marcun Varda N, Zagradisnik B, Herodez SS, Kokalj Vokac N, Gregoric A. Polymorphisms in four candidate genes in young patients with essential hypertension. *Acta Paediatr*. 2006 Mar; 95(3):353-8.
- Marro ML, Scremin OU, Jordan MC, Huynh L, Porro F, Roos KP, Gajovic S, Baralle FE, Muro AF. Hypertension in beta-adducin-deficient mice. *Hypertension*. 2000 Sep; 36(3):449-53.
- Martin ER, Kaplan NL, Weir BS. Tests for linkage and association in nuclear families. *Am J Hum Genet*. 1997 Aug; 61(2):439-48.
- Martín DN, Andreu EP, Ramírez Lorca R, García-Junco PS, Vallejo Maroto I, Santos RA, Miranda Guisado ML, Grijalvo OM, Ortiz JV, Carneado de la Fuente J. G-protein beta-3 subunit gene C825 T polymorphism: influence on plasma sodium and potassium concentrations in essential hypertensive patients. *Life Sci*. 2005 Oct 21; 77(23):2879-86.
- Matsubara M, Metoki H, Katsuya T, Kikuya M, Suzuki M, Michimata M, Araki T, Hozawa A, Tsuji I, Ogihara T, Imai Y. T+31C polymorphism (M235T) of the angiotensinogen gene and home blood pressure in the Japanese general population: the Ohasama Study. *Hypertens Res*. 2003 Jan; 26(1):47-52.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*. 1998 Jul; 32(1):3-8.
- Molarius A, Seidell JC, Sans S, Tuomilehto J, Kuulasmaa K. Varying sensitivity of waist action levels to identify subjects with overweight or obesity in 19 populations of the WHO MONICA Project. *J Clin Epidemiol*. 1999 Dec; 52(12):1213-24.

- Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu AL, Nagel M. Polymorphisms of the insertion / deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC Nephrol*. 2005 Jan 11; 6(1):1.
- Moore JH. The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. *Hum Hered*. 2003; 56(1-3):73-82.
- Morshed M, Khan H, Akhteruzzaman S. Association between angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and hypertension in selected individuals of the Bangladeshi population. *J Biochem Mol Biol*. 2002 May 31; 35(3):251-4.
- Namkung J, Kim K, Yi S, Chung W, Kwon MS, Park T. New evaluation measures for multifactor dimensionality reduction classifiers in gene-gene interaction analysis. *Bioinformatics*. 2009 Feb 1; 25(3):338-45.
- Newhouse SJ, Wallace C, Dobson R, Mein C, Pembroke J, Farrall M, Clayton D, Brown M, Samani N, Dominiczak A, Connell JM, Webster J, Lathrop GM, Caulfield M, Munroe PB. Haplotypes of the WNK1 gene associate with blood pressure variation in a severely hypertensive population from the British Genetics of Hypertension study. *Hum Mol Genet*. 2005 Jul 1; 14(13):1805-14.
- Niu T, Yang J, Wang B, Chen W, Wang Z, Laird N, Wei E, Fang Z, Lindpaintner K, Rogus JJ, Xu X. Angiotensinogen gene polymorphisms M235T/T174M: no excess transmission to hypertensive Chinese. *Hypertension*. 1999 Feb; 33(2):698-702.
- Norton GR, Brooksbank R, Woodiwiss AJ. Gene variants of the renin-angiotensin system and hypertension: from a trough of disillusionment to a welcome phase of enlightenment? *Clin Sci (Lond)*. 2010 Jan 26; 118(8):487-506. Review.
- O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D. 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. *Circulation*. 1998 May 12; 97(18):1766-72.
- Okosun IS, Prewitt TE, Cooper RS. Abdominal obesity in the United States: prevalence and attributable risk of hypertension. *J Hum Hypertens*. 1999 Jul; 13(7):425-30. (a)
- Okosun IS, Forrester TE, Rotimi CN, Osotimehin BO, Muna WF, Cooper RS. Abdominal adiposity in six populations of West African descent: prevalence and population attributable fraction of hypertension. *Obes Res*. 1999 Sep; 7(5):453-62. (b)
- Okosun IS, Choi S, Dent MM, Jobin T, Dever GE. Abdominal obesity defined as a larger than expected waist girth is associated with racial/ethnic differences in risk of hypertension. *J Hum Hypertens*. 2001 May; 15(5):307-12.
- Oladapo OO, Salako L, Sodiq O, Shoyinka K, Adedapo K, Falase AO. A prevalence of cardiometabolic risk factors among a rural Yoruba south-western Nigerian population: a population-based survey. *Cardiovasc J Afr*. 2010 Jan-Feb; 21(1):26-31.
- Olinto MT, Nacul LC, Gigante DP, Costa JS, Menezes AM, Macedo S. Waist circumference as a determinant of hypertension and diabetes in Brazilian women: a population-based study. *Public Health Nutr*. 2004 Aug; 7(5):629-35.

- Oliveira Jr AN, Stucchi D, Chagas MF, Brasileiro SS. Comunidades Negras de Ivaporanduva, São Pedro, Pedro Cubas, Sapatu, Nhunguara, André Lopes, Maria Rosa e Pilões in Andrade T, Pereira CAC, Andrade MRO (eds.) - *Negros do Ribeira: reconhecimento étnico e conquista do território*. ITESP: Páginas e Letras. São Paulo, SP, Brasil: Editora Gráfica, 2000.
- Park EY, Ahn HM, Lee JA, Hong YM. Insertion/deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in Korean hypertensive adolescents. *Heart Vessels*. 2009 May; 24(3):193-8.
- Parra EJ, Marcini A, Akey J, Martinson J, Batzer MA, Cooper R, Forrester T, Allison DB, Dekka R, Ferrell RE, Shriver MD. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am J Hum Genet*. 1998 Dec; 63(6):1839-51.
- Parra EJ, Kittles RA, Argyropoulos G, Pfaff CL, Hiester K, Bonilla C, Sylvester N, Parrish-Gause D, Garvey WT, Jin L, McKeigue PM, Kamboh MI, Ferrell RE, Pollitzer WS, Shriver MD. Ancestral proportions and admixture dynamics in geographically defined African Americans living in South Carolina. *Am J Phys Anthropol*. 2001 Jan; 114(1):18-29.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 7; 100(1):177-82.
- Pedroso Jr. NN, Murrieta, RSS, Adams C. A Agricultura de Corte e Queima: um Sistema em Transformação. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Humanas*, v. 3, p. 153-174, 2008.
- Pereira AC, Mota GF, Cunha RS, Herbenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. Angiotensinogen 235T allele "dosage" is associated with blood pressure phenotypes. *Hypertension*. 2003 Jan;41(1):25-30.
- Pereira AC, Sposito AC, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Mill JG, Krieger JE. Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure. *Atherosclerosis*. 2006 Jan; 184(1):193-200.
- Pereira TV, Rudnicki M, Cheung BM, Baum L, Yamada Y, Oliveira PS, Pereira AC, Krieger JE. Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *J Hypertens*. 2007 Sep; 25(9):1763-74. Review.
- Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered*. 2006; 62(4):190-5.
- Poch E, González D, Gómez-Angelats E, Enjuto M, Paré JC, Rivera F, de La Sierra A. G-Protein beta(3) subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Hypertension*. 2000 Jan; 35(1 Pt 2):214-8.
- Premont RT, Macrae AD, Stoffel RH, Chung N, Pitcher JA, Ambrose C, Inglese J, MacDonald ME, Lefkowitz RJ. Characterization of the G protein-coupled receptor

- kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J Biol Chem.* 1996 Mar 15; 271(11):6403-10.
- Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet.* 1999 Jul; 65(1):220-8.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000 Jun; 155(2):945-59.
- Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, de O Dalalio MM, Visentainer JE, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. *Hum Biol.* 2000 Aug; 72(4):597-617.
- Procopciuc L, Jebeleanu G, Surcel I, Puscas M. Angiotensinogen gene M235T variant and pre-eclampsia in Romanian pregnant women. *J Cell Mol Med.* 2002 Jul-Sep; 6(3):383-8.
- Rabinowitz D, Laird N. A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. *Hum Hered.* 2000 Jul-Aug; 50(4):211-23.
- Rafiq S, Anand S, Roberts R. Genome-wide association studies of hypertension: have they been fruitful? *J Cardiovasc Transl Res.* 2010 Jun; 3(3):189-96.
- Renfrew C, Boyle K. Archeogenetics: DNA and the population prehistory of Europe. Cambridge: McDonald Institute for Archaeological Research, 2000.
- Ribeiro D. The Brazilian People: The Formation and Meaning of Brazil. University Press of Florida, 2000.
- Ribeiro GG, De Lima RR, Wiesel CE, Ferreira LB, Sousa SM, Rocha DM, Canas Mdo C, Nardelli-Costa J, Klautau-Guimarães Mde N, Simões AL, Oliveira SF. Afro-derived Brazilian populations: male genetic constitution estimated by Y-chromosomes STRs and AluYAP element polymorphisms. *Am J Hum Biol.* 2009 May-Jun; 21(3):354-6.
- Ribeiro-dos-Santos AK, Pereira JM, Lobato MR, Carvalho BM, Guerreiro JF, Batista Dos Santos SE. Dissimilarities in the process of formation of Curiaú, a semi-isolated Afro-Brazilian population of the Amazon region. *Am J Hum Biol.* 2002 Jul-Aug; 14(4):440-7.
- Ribeiro-Rodrigues EM, dos Santos NP, dos Santos AK, Pereira R, Amorim A, Gusmão L, Zago MA, dos Santos SE. Assessing interethnic admixture using an X-linked insertion-deletion multiplex. *Am J Hum Biol.* 2009 Sep-Oct; 21(5):707-9.
- Richart T, Thijs L, Kuznetsova T, Tikhonoff V, Zagato L, Lijnen P, Fagard R, Wang J, Bianchi G, Staessen JA. Intra-erythrocyte cation concentrations in relation to the C1797T beta-adducin polymorphism in a general population. *J Hum Hypertens.* 2007 May; 21(5):387-92.
- 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 Oct; 86(4):1343-6.
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science.* 1996 Sep 13; 273(5281):1516-7.
- Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet.* 2001 Jul; 69(1):138-47.
- Rincon, D. Estudos de DNA Mitocondrial em Populações Remanescentes de Quilombos do Vale do Ribeira-São Paulo. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, 2009.
- Rodríguez-Pérez JC, Rodríguez-Esparragón FJ, Hernández-Perera O, Fiuza-Pérez MD, Anabitarte-Prieto A, Losada-Cabrera A. Effects of the angiotensinogen gene M235T and A(-6)G variants on blood pressure and other vascular risk factors in a Spanish population. *J Hum Hypertens.* 2000 Dec; 14(12):789-93.
- Rosário TM, Scala LC, França GV, Pereira MR, Jardim PC. Prevalence, control and treatment of arterial hypertension in Nobres - MT. *Arq Bras Cardiol.* 2009 Dec; 93(6):622-8, 672-8.
- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW. Genetic structure of human populations. *Science.* 2002 Dec 20; 298(5602):2381-5.
- Roszkopf D, Schürks M, Rimmbach C, Schäfers R. Genetics of arterial hypertension and hypotension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007 Feb;374(5-6):429-69. Jan 30. Review.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000; 132:365-86.
- Sakuma T, Hirata RD, Hirata MH. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. *J Clin Lab Anal.* 2004; 18(6):309-16.
- Sallese M, Mariggiò S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B, De Blasi A. G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. *J Biol Chem.* 1997 Apr 11; 272(15):10188-95.
- Salzano FM, Freire-Maia N. Problems in the Human Biology. A study of Brazilian Population. Detroit, USA, Wayne State University Press, 1970.
- Salzano FM. Human races: myth, invention or reality? *Interviência*, 22(5): 221-227 (1997). URL: <http://www.interciencia.org.ve>
- Salzano FM. Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Cienc*, v. 74, n. 2, p. 223-63, Jun 2002.

- Salzano FM, Bortolini MC. Evolution and Genetics of Latin American Population. Cambridge, University Press, 2002.
- Sanada H, Yatabe J, Midorikawa S, Hashimoto S, Watanabe T, Moore JH, Ritchie MD, Williams SM, Pezzullo JC, Sasaki M, Eisner GM, Jose PA, Felder RA. Single-nucleotide polymorphisms for diagnosis of salt-sensitive hypertension. *Clin Chem*. 2006 Mar; 52(3):352-60.
- Sandrim VC, Coelho EB, Nobre F, Arado GM, Lanchote VL, Tanus-Santos JE. Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects. *Atherosclerosis*. 2006 Jun; 186(2):428-32.
- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat*. 2010 Feb; 31(2):184-90.
- Sartori M, Semplicini A, Siffert W, Mormino P, Mazzer A, Pegoraro F, Mos L, Winnicki M, Palatini P. G-protein beta3-subunit gene 825T allele and hypertension: a longitudinal study in young grade I hypertensives. *Hypertension*. 2003 Nov; 42(5):909-14.
- Scliar MO, Vaintraub MT, Vaintraub PM, Fonseca CG. Brief communication: Admixture analysis with forensic microsatellites in Minas Gerais, Brazil: the ongoing evolution of the capital and of an African-derived community. *Am J Phys Anthropol*. 2009 Aug; 139(4):591-5.
- Seidlerová J, Staessen JA, Bochud M, Nawrot T, Casamassima N, Citterio L, Kuznetsova T, Jin Y, Manunta P, Richart T, Struijker-Boudier HA, Fagard R, Filipovský J, Bianchi G. Arterial properties in relation to genetic variations in the adducin subunits in a white population. *Am J Hypertens*. 2009 Jan; 22(1):21-6.
- Shoji M, Tsutaya S, Saito R, Takamatu H, Yasujima M. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci*. 2000 May 19; 66(26):2557-62.
- Shriver MD, Smith MW, Jin L, Marcini A, Akey JM, Deka R, Ferrell RE. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet*. 1997 Apr; 60(4):957-64.
- Schunkert H, Hense HW, Döring A, Riegger GA, Siffert W. Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. *Hypertension*. 1998 Sep; 32(3):510-3.
- Sichieri R, Siqueira KS, Moura AS. Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 May; 24(5):614-8.
- Sichieri R, Oliveira MC, Pereira RA. High prevalence of hypertension among Black and Mulatto women in a Brazilian survey. *Ethn Dis*. 2001 Autumn; 11(3):412-8.

- Siffert W, Roskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet.* 1998 Jan; 18(1):45-8.
- Siffert W, Forster P, Jöckel KH, Mvere DA, Brinkmann B, Naber C, Crookes R, Du P Heyns A, Epplen JT, Fridley J, Freedman BI, Müller N, Stolke D, Sharma AM, Al Moutaery K, Grosse-Wilde H, Buerbaum B, Ehrlich T, Ahmad HR, Horsthemke B, Du Toit ED, Tiilikainen A, Ge J, Wang Y, Roskopf D, et al. Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Sep; 10(9):1921-30. (a)
- Siffert W, Naber C, Walla M, Ritz E. G protein beta3 subunit 825T allele and its potential association with obesity in hypertensive individuals. *J Hypertens.* 1999 Aug; 17(8):1095-8. (b)
- Siffert W. G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes. *Annu Rev Med.* 2005; 56:17-28. Review.
- Siragy HM, Carey RM. Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2010;31(6):541-50.
- Snyder PM. Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endocrinology.* 2005 Dec; 146(12):5079-85.
- Speirs HJ, Katyk K, Kumar NN, Benjafield AV, Wang WY, Morris BJ. Association of G-protein-coupled receptor kinase 4 haplotypes, but not HSD3B1 or PTP1B polymorphisms, with essential hypertension. *J Hypertens.* 2004 May; 22(5):931-6.
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* 1993 Mar; 52(3):506-16.
- Spielman RS, Ewens WJ. A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet.* 1998 Feb; 62(2):450-8.
- Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, Vlietinck R, Fagard R. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens.* 1997 Dec; 15(12 Pt 2):1579-92.
- Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, Emelianov D, Vlietinck R, Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J Hypertens.* 1999 Jan; 17(1):9-17.
- Staessen JA, Kuznetsova T, Zhang H, Maillard M, Bochud M, Hasenkamp S, Westerkamp J, Richart T, Thijs L, Li X, Brand-Herrmann SM, Burnier M, Brand E. Blood pressure and renal sodium handling in relation to genetic variation in the DRD1 promoter and GRK4. *Hypertension.* 2008 Jun; 51(6):1643-50.
- Strachan T, Read A. *Human Molecular Genetics.* 4th ed. Garland Science, USA. 2010.

- Sun C, Wang JJ, Islam FM, Heckbert SR, Klein R, Siscovick DS, Klein BE, Wong TY. Hypertension genes and retinal vascular calibre: the Cardiovascular Health Study. *J Hum Hypertens*. 2009 Sep; 23(9):578-84.
- Swift PA, Macgregor GA. Genetic variation in the epithelial sodium channel: a risk factor for hypertension in people of African origin. *Adv Ren Replace Ther*. 2004 Jan; 11(1):76-86. Review.
- Tang H, Quertermous T, Rodriguez B, Kardia SL, Zhu X, Brown A, Pankow JS, Province MA, Hunt SC, Boerwinkle E, Schork NJ, Risch NJ. Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies. *Am J Hum Genet*. 2005 Feb; 76(2):268-75.
- Thibonnier M, Schork NJ. The genetics of hypertension. *Curr Opin Genet Dev*. 1995 Jun; 5(3):362-70.
- Thorogood M, Connor M, Tollman S, Lewando Hundt G, Fowkes G, Marsh J. A cross-sectional study of vascular risk factors in a rural South African population: data from the Southern African Stroke Prevention Initiative (SASPI). *BMC Public Health*. 2007 Nov 13;7:326.
- Tikhonoff V, Kuznetsova T, Stolarz K, Bianchi G, Casiglia E, Kawecka-Jaszcz K, Nikitin Y, Tizzzone L, Wang JG, Staessen JA. beta-Adducin polymorphisms, blood pressure, and sodium excretion in three European populations. *Am J Hypertens*. 2003 Oct; 16(10):840-6. (a)
- Tikhonoff V, Kuznetsova T, Stolarz K, Bianchi G, Casiglia E, Kawecka-Jaszcz K, Nikitin Y, Tizzzone L, Wang JG, Staessen JA; European Project on Genes in Hypertension Investigators. Blood pressure phenotypes in relation to the beta-adducin C1797T polymorphism in the European Project on Genes in Hypertension (EPOGH). *Blood Press Monit*. 2003 Aug; 8(4):151-4. (b)
- Tishkoff SA, Williams SM. Genetic analysis of African populations: human evolution and complex disease. *Nat Rev Genet*. 2002 Aug; 3(8):611-21. Review.
- Tobin MD, Tomaszewski M, Braund PS, Hajat C, Raleigh SM, Palmer TM, Caulfield M, Burton PR, Samani NJ. Common variants in genes underlying monogenic hypertension and hypotension and blood pressure in the general population. *Hypertension*. 2008 Jun;51(6):1658-64.
- Tomaszewski M, Charchar FJ, Lacka B, Pesonen U, Wang WY, Zukowska-Szczechowska E, Grzeszczak W, Dominiczak AF. Epistatic interaction between beta2-adrenergic receptor and neuropeptide Y genes influences LDL-cholesterol in hypertension. *Hypertension*. 2004 Nov; 44(5):689-94.
- Tregouet DA, Escolano S, Tiret L, Mallet A, Golmard JL. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet*. 2004;68:165-77.
- Tripodi G, Valtorta F, Torielli L, Chieragatti E, Salardi S, Trusolino L, Menegon A, Ferrari P, Marchisio PC, Bianchi G. Hypertension-associated point mutations in the adducin alpha and beta subunits affect actin cytoskeleton and ion transport. *J Clin Invest*. 1996 Jun 15; 97(12):2815-22.

- Tripodi G, Florio M, Ferrandi M, Modica R, Zimdahl H, Hubner N, Ferrari P, Bianchi G. Effect of Add1 gene transfer on blood pressure in reciprocal congenic strains of Milan rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 12; 324(2):562-8.
- Tsai CT, Fallin D, Chiang FT, Hwang JJ, Lai LP, Hsu KL, Tseng CD, Liao CS, Tseng YZ. Angiotensinogen gene haplotype and hypertension: interaction with ACE gene I allele. *Hypertension*. 2003 Jan; 41(1):9-15.
- Tu IP, Balise RR, Whittemore AS. Detection of disease genes by use of family data. II. Application to nuclear families. *Am J Hum Genet*. 2000 Apr; 66(4):1341-50.
- Umscheid CA, Gross R, Weiner MG, Hollenbeak CS, Tang SS, Turner BJ. Racial disparities in hypertension control, but not treatment intensification. *Am J Hypertens*. 2010 Jan; 23(1):54- 61.
- Vallone PM, Butler JM. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*. 2004 Aug; 37(2):226-31.
- van Rijn MJ, Schut AF, Aulchenko YS, Deinum J, Sayed-Tabatabaei FA, Yazdanpanah M, Isaacs A, Axenovich TI, Zorkoltseva IV, Zillikens MC, Pols HA, Witteman JC, Oostra BA, van Duijn CM. Heritability of blood pressure traits and the genetic contribution to blood pressure variance explained by four blood-pressure-related genes. *J Hypertens*. 2007 Mar; 25(3):565-70.
- Vargens DD, Almendra L, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. Distribution of the GNB3 825C>T polymorphism among Brazilians: impact of population structure. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008 Mar; 64(3):253-6.
- Vehaskari VM. Heritable forms of hypertension. *Pediatr Nephrol*. 2009 Oct; 24(10):1929-37. Review.
- Wang JG, Staessen JA, Barlassina C, Fagard R, Kuznetsova T, Struijker-Boudier HA, Zagato L, Citterio L, Messaggio E, Bianchi G. Association between hypertension and variation in the alpha- and beta-adducin genes in a white population. *Kidney Int*. 2002 Dec; 62(6):2152-9.
- Wang X, Wang S, Lin R, Jiang X, Cheng Z, Turdi J, Ding J, Wu G, Lu X, Wen H. GNB3 gene C825T and ACE gene I/D polymorphisms in essential hypertension in a Kazakh genetic isolate. *J Hum Hypertens*. 2004 Sep; 18(9):663-8. (a)
- Wang JG, Liu L, Zagato L, Xie J, Fagard R, Jin K, Wang J, Li Y, Bianchi G, Staessen JA, Liu L. Renal function in relation to three candidate genes in a Chinese population. *J Mol Med*. 2004 Oct; 82(10):715-22. (b)
- Wang Y, Li B, Zhao W, Liu P, Zhao Q, Chen S, Li H, Gu D. Association study of G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants with essential hypertension in northern Han Chinese. *Ann Hum Genet*. 2006 Nov; 70(Pt 6):778-83.
- Watkins WS, Ricker CE, Bamshad MJ, Carroll ML, Nguyen SV, Batzer MA, Harpending HC, Rogers AR, Jorde LB. Patterns of ancestral human diversity: an analysis of

- Alu-insertion and restriction-site polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2001 Mar; 68(3):738-52.
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2002 Oct; 71(4):854-62.
- Williams SM, Ritchie MD, Phillips JA 3rd, Dawson E, Prince M, Dzhura E, Willis A, Semanya A, Summar M, White BC, Addy JH, Kpodonu J, Wong LJ, Felder RA, Jose PA, Moore JH. Multilocus analysis of hypertension: a hierarchical approach. *Hum Hered.* 2004; 57(1):28-38.
- Yamamoto M, Abe M, Jin JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J. Association of GNB3 gene with pulse pressure and clustering of risk factors for cardiovascular disease in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Apr 9; 316(3):744-8.
- Yoo JH. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is associated with essential hypertension in men born during the Pacific War. *Mech Ageing Dev.* 2005 Aug; 126(8):899-905.
- Young JH, Chang YP, Kim JD, Chretien JP, Klag MJ, Levine MA, Ruff CB, Wang NY, Chakravarti A. Differential susceptibility to hypertension is due to selection during the out-of-Africa expansion. *PLoS Genet.* 2005 Dec; 1(6):e82.
- Zagato L, Modica R, Florio M, Torielli L, Bihoreau MT, Bianchi G, Tripodi G. Genetic mapping of blood pressure quantitative trait loci in Milan hypertensive rats. *Hypertension.* 2000 Nov; 36(5):734-9.
- Zeng C, Sanada H, Watanabe H, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. *Physiol Genomics.* 2004 Nov 17; 19(3):233-46. Review.
- Zöllner S, von Haeseler A. A coalescent approach to study linkage disequilibrium between single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2000 Feb; 66(2):615-28.
- Zhao Q, Su SY, Chen SF, Li B, Gu DF. Association study of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with essential hypertension in northern Han Chinese. *Chin Med J (Engl).* 2006 Jul 5; 119(13):1065-71.
- Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, McKenzie CA, Luke A, Chen G, Elston RC, Ward R. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. *Am J Hum Genet.* 2001 May; 68(5):1139-48.
- Zhu H, Lu Y, Wang X, Treiber FA, Harshfield GA, Snieder H, Dong Y. The G protein-coupled receptor kinase 4 gene affects blood pressure in young normotensive twins. *Am J Hypertens.* 2006 Jan; 19(1):61-6.
- Zintzaras E, Kitsios G, Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. *Hypertension.* 2006 Oct; 48(4):700-10.

Web sites

FBAT home page: <http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/default.html>

Fundação Palmares: <http://www.palmares.gov.br>

International collaborative study on multilocus interactions in essential hypertension: <http://www.hypertensiongenetics.org>

ISA (Instituto Socioambiental): <http://www.socioambiental.org/>

ITESP (Fundação Instituto de Terras do Estado de São Paulo “José Gomes da Silva”): <http://www.itesp.sp.gov.br/>

Primer3 software: www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3

STRUCTURE software: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>

THESIAS 3.1 *software* (<http://genecanvas.ecgene.net/>).