



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari  
Dipartimento Struttura Clinica Medica – Patologia Speciale Medica

Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia Medica  
XXI ciclo

Tesi finale di Dottorato

**Il gene del cotrasportatore NaCl tiazide-sensibile è associato  
con l'attività reninica plasmatica e l'effetto antiipertensivo dei  
diuretici tiazidici nell'ipertensione arteriosa essenziale**

Coordinatore:

*Prof. Nicola Glorioso*

Relatore:

*Prof. Nicola Glorioso*

Dottorando:

*Dr.ssa Silvia Pitzoi*

Anno Accademico 2007-2008

## INDICE

<b>SOMMARIO</b>	<b>pag 2</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>pag 3</b>
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>pag 7</b>
<b>METODI</b>	
• Pazienti e protocollo clinico	pag 8
• Identificazione e genotipizzazione degli SNPs	pag 9
• Valutazione del potere statistico	pag 10
• Analisi statistica	pag 10
• Gestione dei test multipli	pag 11
<b>RISULTATI</b>	
• Struttura LD del locus SLC12A3	pag 12
• Associazione con la PRA	pag 13
• Associazione degli aplotipi nel locus SLC12A3 con la PRA	pag 13
• Associazione con potenziali confondenti clinici	pag 14
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>pag 15</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>pag 17</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag 18</b>
<b>TABELLE</b>	<b>pag 21</b>
<b>LEGENDE</b>	<b>pag 24</b>
<b>FIGURE</b>	<b>pag 25</b>

## SOMMARIO

La risposta alla terapia è per buona parte ascrivibile alle caratteristiche genetiche del paziente a cui una certa terapia viene somministrata. Questo concetto è quanto mai valido in ambito cardiovascolare. L'ipertensione arteriosa è una malattia poligenica che deriva dalla interazione delle caratteristiche innate dei pazienti con l'ambiente (interazione genetico-ambientale). Fra i farmaci usati nella terapia dell'ipertensione arteriosa, i diuretici tiazidici ricoprono un ruolo fondamentale data la documentata capacità di protezione dagli eventi connessi valutata in numerosi trials clinici controllati. Polimorfismi a carico di diversi geni (alfa-adducina, angiotensinogeno, ACE, 11beta-HSD, G-proteins) sono stati associati alla risposta antiipertensiva delle tiazidi. I dati, tuttavia, sono rimasti fino ad ora inconclusivi a causa di:

1. scarsa numerosità delle coorti analizzate
2. valutazione di pazienti sottoposti a brevi wash-out di precedente terapia
3. eterogeneità del genoma dei pazienti studiati
4. assenza di fenotipi intermedi che completino in modo coerente la catena funzionale che lega il genotipo alla espressione fenotipica finale
5. contraddittorietà delle interazioni evidenziate fra diversi polimorfismi

Abbiamo quindi analizzato una numerosa coorte di ipertesi essenziali a genoma omogeneo e mai trattati con l'obiettivo di analizzare l'associazione di polimorfismi del gene del cotrasportatore renale "tiazide-sensibile" con la risposta antiipertensiva alla terapia con idroclorotiazide e con fenotipi intermedi che esprimessero lo "stato volumetrico" dei pazienti. Lo studio è stato condotto per mezzo della analisi di Linkage Disequilibrium della struttura del gene con analisi dei "Single Nucleotide Polymorphisms" (SNPs) esistenti all'interno dei "blocchi alplotipici" del gene stesso. Abbiamo evidenziato diverse variazioni di SNPs nei diversi blocchi alplotipici alcune associate ai livelli di attività reninica plasmatica, espressione dello stato volumetrico, altre alla risposta alla terapia con idroclorotiazide a 4 ed 8 settimane. Nessuna delle variazioni degli SNPs è risultata associata ai livelli di pressione arteriosa prima del trattamento. Il nostro studio aggiunge un ulteriore tassello al mosaico genico che regola la risposta alle tiazidi e conferma che 1. diverse variazioni all'interno dello stesso gene possono regolare diverse espressioni fenotipiche del gene stesso, e 2. la regolazione genica della pressione arteriosa e della risposta ai farmaci antiipertensivi possono essere regolate da meccanismi del tutto indipendenti.

## INTRODUZIONE

L'ipertensione arteriosa è tra le malattie più diffuse nella popolazione mondiale: la sua prevalenza stimata è pari a circa il 30-40% della popolazione adulta nei paesi industrializzati e rappresenta uno dei principali fattori di rischio per complicanze cardiovascolari, cerebrovascolari e renali. La sua eziologia è multifattoriale comprendendo sia fattori genetici che ambientali: dal punto di vista genetico c'è ormai completo accordo sulla natura poligenica della malattia mentre la sensibilità al sale alimentare viene vista come l'elemento chiave fra i fattori ambientali.

Il rene gioca un ruolo fondamentale nell'omeostasi del sodio ( $\text{Na}^+$ ) ed è la chiave della regolazione a breve e lungo termine della pressione arteriosa (PA) (1) e la sua responsabilità nella patogenesi dell'ipertensione è stata dimostrata nei modelli animali e nell'uomo sia nelle forme secondarie sia nella cosiddetta "ipertensione essenziale" (2).

Oltre che attraverso la regolazione diretta dell'assorbimento del  $\text{Na}^+$  il rene è anche l'organo secettore di sostanze i cui effetti sono sia di regolazione diretta del tono arteriolare e della regolazione dello "stato volumetrico" degli individui sia di interazione con i sistemi di trasporto del  $\text{Na}^+$  attraverso le membrane tubulari renali. Per esempio, la renina, sintetizzata e secreta dalle cellule juxtaglomerulari della "macula densa", agisce sul suo substrato epatico, l'angiotensinogeno, clivando un peptide composto da 10 aminoacidi e biologicamente inattivo chiamato "angiotensina I" da cui, successivamente, vengono staccati due aminoacidi con formazione di un octapeptide denominato "angiotensina II". Quest'ultima è il reale effettore vasoattivo: le sue azioni principali, infatti, sono di vasocostrizione diretta sulle arteriole precapillari, di stimolazione della sete, di stimolazione della secrezione di aldosterone (il principale mineralcorticoide umano), di facilitazione della trasmissione neuromuscolare, etc.

Nell'epitelio renale il riassorbimento di  $\text{Na}^+$  avviene grazie all'attività di trasportatori di membrana e canali ionici. Nelle cellule dell'epitelio tubulare esistono trasportatori per il  $\text{Na}^+$  sia a livello basolaterale ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi) sia a livello apicale. È stato ampiamente dimostrato che nel controllo del trasporto trans-epiteliale esiste un continuo cross-talking tra questi due gruppi di trasportatori epiteliali. In particolare, a

livello della porzione spessa ascendente dell'ansa di Henle (TAL) l'entrata del  $\text{Na}^+$  nella cellula avviene grazie alla presenza del co-trasporto  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  (NKCC2) che risulta in relazione funzionale con il riciclo del potassio ( $\text{K}^+$ ) attraverso la membrana luminale, mediato da specifici canali del  $\text{K}^+$  (ROMK), ed accompagnato dalla fuoriuscita del cloro ( $\text{Cl}^-$ ) attraverso la membrana basolaterale grazie ai canali del  $\text{Cl}^-$  (ClC-Kb e Barttin) (3).

Nel tubulo distale e nel dotto collettore il processo di riassorbimento del  $\text{Na}^+$  avviene attraverso il co-trasporto  $\text{Na}^+-\text{Cl}^-$  (NCCT) e ben definiti canali del  $\text{Na}^+$  (EnaC) a cui spetta il controllo finale del riassorbimento sodico.

In particolare, NCCT rappresenta: 1. il principale mediatore del riassorbimento del  $\text{Na}^+$  e del  $\text{Cl}^-$  nel tubulo contorto distale, determinando una significativa frazione del riassorbimento netto di sodio 2. il target dei diuretici tiazidici (4): per tal motivo chiamato anche "canale tiazide-sensibile" (TSC, gene SLC12A3).

L'abilità dei diuretici tiazidici, tra i farmaci anti-ipertensivi più comunemente raccomandati come terapia iniziale per l'ipertensione arteriosa non complicata (5,6,7), di diminuire la PA può infatti essere attribuibile, insieme a meccanismi ancora sconosciuti, alla riduzione del volume del fluido intravascolare attraverso l'inibizione di NCCT e di conseguenza del riassorbimento del  $\text{Na}^+$ . Dobbiamo comunque sottolineare come negli ultimi anni la letteratura internazionale abbia mostrato che l'efficacia antiipertensiva dei diuretici tiazidici possa in realtà essere un fenomeno poligenico risultato dell'interazione combinata di più "minor effect genes" (8,9,10,11). Il fatto che la risposta antiipertensiva ai diuretici tiazidici nell'ipertensione arteriosa essenziale sia un fenomeno complesso governato da un preciso pattern genetico e non solo l'epifenomeno della dispersione di acqua e sale, emerge anche dai dati che indicano che i polimorfismi genetici coinvolti nella regolazione della pressione arteriosa possono essere del tutto diversi da quelli che regolano la risposta antiipertensiva ai diuretici tiazidici (9).

Ormai da alcune decadi è ben dimostrato come lo stesso carico acuto intravenoso di  $\text{Na}^+$  sia eliminato in maniera completa dagli esseri umani. Questo fenomeno, tuttavia, avviene in due modi distinti: nel primo modo, il carico di  $\text{Na}^+$  viene eliminato senza alcuna modifica della pressione arteriosa mentre nel secondo modo durante la fase di infusione la pressione arteriosa si modifica sensibilmente per ritornare poi al valore pre-infusione nell'arco di qualche tempo. I pazienti del primo tipo vengono così definiti "sale-resistenti", quelli del secondo tipo "sale-sensibili" (12): dall'epoca

della sua scoperta il concetto di “sodio-sensibilità” ha dimostrato tutta la sua rilevanza non solo nella genesi e mantenimento dell’ipertensione arteriosa ma anche nella genesi del danno d’organo che si associa all’ipertensione arteriosa stessa (13).

I meccanismi di “gestione del Na<sup>+</sup>” sono in gran parte regolati geneticamente: esiste un rapporto inverso fra il grado di espansione sodica e, conseguentemente, volumetrica ed i livelli di attività reninica circolanti nel plasma (14). Gli ipertesi caratterizzati da una attività reninica più bassa, come per esempio i pazienti di razza nera e gli anziani e, in generale, i pazienti sodio-sensibili, mostrano una maggiore riduzione della pressione arteriosa dopo trattamento con diuretici tiazidici (15), rispetto a coloro che mostrano una attività reninica più elevata. Questa caratteristica è verosimile che possa essere sotto controllo poligenico. In realtà per alcuni geni della “sodio-sensibilità” è stata già testata l’associazione con la risposta al trattamento diuretico (8-11), con risultati tuttavia non conclusivi. A nostra conoscenza non esistono in letteratura lavori formali relativi all’associazione del “bersaglio” genico più plausibile per giustificare la componente genetica della risposta alle tiazidi nell’ipertensione arteriosa essenziale. Il nostro Gruppo ha precedentemente documentato come i geni che regolano la risposta ai diuretici tiazidici e l’ipertensione arteriosa essenziale possono essere in parte non coincidenti (9).

Al fine di ridurre quanto più possibile il “background noise” che condiziona in modo rilevante gli studi di associazione, gli studi di farmacogenomica condotti dal nostro Gruppo sono stati tradizionalmente effettuati in pazienti con ipertensione arteriosa essenziale mai sottoposti in precedenza a trattamenti antiipertensivi: inoltre, abbiamo sempre utilizzato pazienti provenienti da aree geografiche della Sardegna caratterizzate da alta e documentata omogeneità genetica e da stili di vita omogenei (16).

In questo lavoro abbiamo ritenuto opportuno condurre un’analisi esauriente della struttura di Linkage Disequilibrium del gene SLC12A3 in un campione di pazienti con ipertensione essenziale sottoposti a terapia con diuretici tiazidici e sottoposti a introito sodico controllato.

Il Linkage Disequilibrium (LD) è l’associazione non-casuale tra gli alleli di differenti loci che costituiscono di solito un particolare aplotipo ancestrale, diffuso nella popolazione perché trasmesso lungo la discendenza da un comune progenitore. Per questo motivo il LD è maggiore in popolazioni omogenee, cioè originate da un

nucleo di individui fondatori come le popolazioni sarda o finlandese. Le migrazioni infatti generano eterogeneità genetica ed aplotipi differenti associati allo stesso tratto abbassando i valori di LD.

La metodologia di studio del LD è un'importante strumento per individuare regioni cromosomiche di limitata ampiezza in cui si collocano i geni per una data malattia (mappaggio ad alta risoluzione) e si avvale dell'analisi molecolare di varianti alleliche come gli SNPs, che costituiscono aplotipi in pazienti tra loro apparentemente non imparentati (17). Infatti è prevedibile che pazienti che hanno ereditato lo stesso segmento cromosomico, definito dal medesimo aplotipo, abbiano ereditato anche la stessa mutazione in esso contenuto.

L' aplotipo infatti è una combinazione di varianti all'eliche lungo un cromosoma o segmento cromosomico contenente loci in LD, cioè strettamente associati tra di loro. L'associazione statistica tra loci si manifesta in assenza di ricombinazione tra i loci stessi. Per quanto riguarda gli autosomi (cromosomi non sessuali) e le regioni pseudoautosomiche dei cromosomi sessuali questo può essere dovuto alla vicinanza fisica tra i loci considerati e all'assenza di hot-spot di ricombinazione tra di loro. Invece gli alleli della regione non ricombinante del cromosoma Y (NRY) sono sempre associati a formare aplotipi, così come gli alleli del genoma mitocondriale (mtDNA). Infatti queste due porzioni del genoma non ricombinano, essendo ereditate con modalità uniparentali, paterna la prima, materna la seconda. Aplotipi differenti sono generati da un aplotipo ancestrale per effetto della mutazione ai singoli loci.

## SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio, condotto in una coorte numerosa di pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale, mai trattati, di etnia Sarda, geneticamente omogenei ed a introito sodico stabile nel corso dello studio, è stato quello di definire 1. se e quali SNPs (single nucleotide polymorphisms) o alplotipi all'interno del gene del cotrasportatore Na-Cl, influenzano la risposta al trattamento con diuretici tiazidici, e 2. gli SNP associati con i valori circolanti di attività reninica plasmatica.



## METODI

### Pazienti e protocollo clinico.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico locale.

Sono stati reclutati n=488 pazienti ipertesi mai trattati, provenienti da aree del nord Sardegna caratterizzate da un alto grado di omogeneità genetica (16) così come di condizioni ambientali omogenee, sardi da almeno sei generazioni. Tutti i pazienti afferivano al Centro di Prevenzione, Diagnosi e Terapia dell'Ipertensione arteriosa essenziale e delle complicanze cardiovascolari, ASL n.1, cattedra di Medicina di Urgenza, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Sassari.

La coorte in studio era intenzionalmente composta di pazienti con ipertensione essenziale mai trattata per semplificare la comprensione di una catena molto complessa di eventi che lega i geni ai fenotipi intermedi e finali, per evitare le interferenze di effetti residui dei precedenti trattamenti sulla funzione cellulare.

Dopo l'esclusione di una eventuale un'ipertensione secondaria, grazie ad un completo workout diagnostico, i pazienti hanno firmato un consenso informato specifico per studi genetici, anch'esso precedentemente approvato dal nostro Comitato Etico Locale (ASL n.1, Sassari).

Sono state registrate le pressioni arteriose in posizione seduta: sistolica (PAS), diastolica (PAD) e media (PAM; calcolata secondo la formula standard  $PAM = [(PAS - PAD) * 1/3] + PAD$ ) e l'ipertensione è stata definita secondo le specifiche del JNC 7 Report (5). Soltanto pazienti affetti da ipertensione arteriosa lieve-moderata venivano considerati per l'inclusione nello studio.

Dopo la prima visita tutti i pazienti seguivano un periodo di run-in di 8 settimane per confermare la diagnosi di ipertensione essenziale lieve-moderata, non complicata e asintomatica, durante il quale la PA veniva misurata ogni settimana al mattino. In ogni occasione sono state registrate 3 misurazioni consecutive, nello stesso braccio e dalla stessa infermiera, con uno strumento elettronico automatico certificato (Omron 705 IT) e ne è stata fatta la media. Nel caso in cui la differenza tra le misurazioni al braccio destro e quelle al braccio sinistro risultasse significativa, veniva scelto il braccio in cui le misurazioni erano più alte.

Sono stati misurati la PRA basale in posizione eretta,  $Na^+$ ,  $K^+$  e creatinina sierici e  $Na^+$  e  $K^+$  urinario delle 24h (fotometria a fiamma) (tab 1): a questo punto veniva iniziato il trattamento con idroclorotiazide 25mg/die.

La PA (tab1) e gli effetti collaterali sono stati valutati dopo 4 e dopo 8 settimane. Per non valutare pazienti con ipertensione arteriosa a diversa eziologia, sono stati arruolati solo i pazienti con età inferiore ai 60 anni, e che presentassero valori di PA >140/90 mmHg al momento di ogni visita programmata per tutto l'intero periodo di run-in. Ai pazienti veniva chiesto di mantenere un apporto costante di Na<sup>+</sup> pari a 150mEq/24h (valori di bilancio sodico delle 24 ore medio nel Nord Sardegna).

### **Identificazione e genotipizzazione degli SNPs.**

Il gene SLC12A3 mappa sul cromosoma 16 nella regione q3 ed è costituito da 26 esoni e si estende per 49.48 Kb. L'intera regione, di 92 Kb, è stata studiata con 15 "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) (tab2). Gli SNPs sono stati cercati in database pubblici usando il sito International HapMap Project (<http://www.hapmap.org/>). Sono stati considerati solo quegli SNPs che presentavano una frequenza dell'allele minore ("minor allele frequency", MAF) >0.09 e una distanza inter-marker media di 5.1Kb con il gap più piccolo pari a 1.6 e il più grande di 12.6Kb (Fig 1). Gli SNPs nella regione del SLC12A3 saranno riportati d'ora in poi come SNP1 fino a SNP15 (tab 2). Il DNA genomico da sangue periferico è stato ottenuto con il kit di estrazione (TALENT, Trieste, Italy).

La genotipizzazione è stata realizzata con la tecnologia della discriminazione allelica usando sonde Taqman® fluorescenti in un sistema 7500 Fast Real Time (Applied Biosystems Foster City CA), che permette di vedere in tempo reale l'aumento di DNA amplificato. Le sonde sono costituite da due tipi di fluorofori, le parti fluorescenti della proteina reporter. Mentre le sonde sono staccate o attaccate al template e quindi prima che la Taq- polimerasi agisca, il fluoroforo Quencer, all'estremità 3' della sonda, riduce la fluorescenza del fluoroforo Reporter, a quella 5', attraverso la Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), che consiste nell'inibizione di un colore causata da un'altro senza emissione di un protone. In seguito a denaturazione e raffreddamento della reazione, sia la sonda Taqman® che il primer si legano alla sequenza complementare sul DNA template. La Taq- polimerasi a questo punto inizia ad aggiungere nucleotidi estendendo il filamento di DNA, e stacca la sonda Taqman®. Questo fa sì che il Quencer si separi dal Reporter che emette la sua energia subito quantificata da un computer.

L'amplificazione è stata realizzata in 10 ul di volume finale con 20ng di DNA genomico e le seguenti condizioni: 95°C per 20" e 40 cicli ognuno di 95°C per 3" e

60°C per 30". La variazione dello SNP è stata valutata attraverso il saggio di discriminazione allelica utilizzando il programma Applied Biosystems Software Package SDS 2.1. Tutte le ambiguità genotipiche venivano risolte manualmente controllando la linea di fluorescenza e in ogni caso venivano ripetute due volte.

La struttura aploipica è stata accertata genotipizzando 15 SNPs che si trovavano in tutta la lunghezza del gene del co-trasportatore Na-Cl tiazide sensibile.

### **Valutazione del potere statistico della coorte.**

Il potere statistico è stato stimato secondo differenti assunzioni riguardanti l'effetto della grandezza del campione, usando l'approccio proposto da Purcell et al. (18) ed è stato concluso che la grandezza del campione in studio ha un potere pari a 0.8 con un alpha di 0.05 per un varianza di QTL additiva pari a 0.1.

Il potere è stato stimato assumendo un range variabile di differenze nell'effetto della grandezza per la variabile dipendente che si riferisce alla sodio-sensibilità, usando STATA 9 SE, cercando l'effetto grandezza più basso possibile che poteva offrire abbastanza potere per trovare un risultato significativo, qualora dovesse esserci. Così è stato stimato che il campione in esame permetteva di avere un potere pari a 0.08 con un alpha di 0.05 con una differenza tra le PAM<sub>8</sub> (pressione arteriosa media alla valutazione dopo 8 settimane di terapia) osservate e stimate minori di 1.0 mmHg.

### **Analisi statistica**

L'obiettivo principale era quello di accertare il ruolo del gene SLC12A3 nel controllo della PA/omeostasi del Na<sup>+</sup>: così è stata fatta una analisi ANOVA, in cui il maggiore indicatore dell'omeostasi del volume circolante (cioè la PRA) era misurato come variabile continua, e i vari alleli e SNPs dall'1 al 15 che si trovavano sul gene SLC12A3. In aggiunta a questa analisi, è stata realizzata una statistica descrittiva, usando approcci tradizionali, e un successivo set di analisi secondarie per esplorare le determinanti genetiche dei nostri risultati. Per svolgere queste ulteriori ricerche, sono state utilizzate "funzioni genetiche" implementate in STATA.

Nel dettaglio:

- GENHW è stato usato per testare l'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) di partenza.

- QTLsNP, usato per comparare l'uguaglianza delle medie tra i genotipi, assume un modello genetico codominante per testare sia l'effetto additivo che moltiplicativo.
- QHAPIPF è la procedura adottata per testare l'associazione aplotipica quantitativa; crea un modello di relazione tra una variabile continua normalmente distribuita in un campione che rappresenta la popolazione e i singoli aplotipi stimati (19).
- La fase aplotipica è stata determinata usando un algoritmo Expectation Maximization (EM) che gestisce l'incertezza di fase. In seguito, un modello lineare permette di testare l'associazione del LD con la malattia. Il modello lineare è adattato usando un metodo iterativo proporzionale ("iterative proportional fitting method") il quale, quando il fenotipo è quantitativo, include anche il valore stimato. Il LD a coppie tra tutti gli SNPs è stato determinato usando Haploview 4.0 (20) con l'opzione di determinare i blocchi aplotipici secondo la regola dei 4 gameti.

### **Gestione dei test multipli.**

Seguendo un approccio conservativo, e a dispetto del dibattito ancora aperto circa il bisogno e il migliore metodo per correggere per test multipli negli studi di genomica (21,22), è stato deciso di correggere per test multipli, applicando la correzione di Bonferroni basata su tutti i 15 SNPs analizzati nel locus SLC12A3. In ogni caso, anche applicando un altro "metodo prudente" come la permutazione di ogni singolo data-set, con un numero di permutazioni pari a 10.000, il risultato positivo rimaneva significativo.

## RISULTATI

Settantotto pazienti della coorte iniziale sono stati esclusi durante il periodo di run-in per le seguenti ragioni: normalizzazione della PA o incapacità di seguire la dieta con l'apporto di sodio suggerito (n=14), normalizzazione spontanea della PA (n=38), ipertensione secondaria (n=4), ipertensione sintomatica che richiedeva trattamento immediato (n=9), comorbidità rilevanti (n=5), difficoltà di amplificazione del DNA (n=8). Quindi in realtà sono stati analizzati n=410 pazienti con ipertensione arteriosa essenziale.

La tabella 1 riporta le caratteristiche cliniche ed i principali parametri di laboratorio valutati nella coorte all'atto dell' inclusione nello studio ma prima di iniziare il trattamento con idroclorotiazide: nella stessa tabella viene pure riportata la pressione arteriosa rilevata a 4 ed 8 settimane dall'inizio del trattamento con idroclorotiazide 25 mg/die.

### **Struttura LD del locus SLC12A3.**

La genotipizzazione ha confermato che i 15 SNPs riportati nei database pubblici nella regione SLC12A3 erano polimorfici con MAF simili a quelle riportate. Mediamente la percentuale di successo nella genotipizzazione era il 99.13%. Una descrizione degli SNPs, inclusa la loro posizione nel cromosoma 16, se codificanti o no e la loro rispettiva MAF osservata nella coorte in esame sono riportati in tabella 2. Solo lo SNP 6<sub>A</sub> (p=0.027) e lo SNP 11<sub>A</sub> (p=0.048) deviavano significativamente dall'HWE. Nella parte superiore della figura 1 è mostrato il grado di LD tra gli SNPs analizzati. La regione mostra due blocchi principali di LD ("average pairwise" D' and R<sup>2</sup> pari a 0.63 and 0.16, rispettivamente).

E' stato definito che:

1. SLC12A3 abbraccia 4 blocchi di LD (figura 1);
2. tre SNPs nel primo blocco aplotipico (che costituiscono un unico aplotipo) sono associati con l'attività reninica plasmatica (PRA) basale (figura 2, pannello inferiore);
3. due ulteriori SNPs erano associati con la pressione arteriosa diastolica all'interno del secondo blocco aplotipico (figura 2, pannello superiore).

Abbiamo inoltre confermato il nostro dato pubblicato in precedenza in un'altra coorte, sempre di pazienti del Centro-Nord Sardegna con ipertensione arteriosa essenziale, come la pressione arteriosa basale non è associata con gli SNPs presenti che mappano nella regione.

### **Associazione con la PRA.**

Uno dei due “aims” primari dello studio era quello di valutare il livello di PRA come se fosse l'indicatore principale del rapporto PA/Na<sup>+</sup> omeostasi. Prima di tutto è stata ricercata l'associazione del fenotipo quantitativo PRA basale, in base al bilancio sodico delle 24 ore espresso dalla escrezione sodica urinaria, esaminando ogni polimorfismo individualmente. Dei 15 SNPs testati, 4 hanno mostrato una associazione allelica significativa. Le associazioni alleliche e genotipiche sono rimaste significative dopo la correzione per test multipli (Bonferroni). L'analisi QTLSNP ha mostrato un effetto additivo significativo ( $p < 0.05$ ) per SNP2, SNP3, SNP4 e SNP5, assumendo un modello genetico codominante (tabella 3). Come analisi secondaria è stata testata un'associazione qualitativa genotipo-fenotipo, usando il cut-off arbitrario “alta PRA” secondo il nostro laboratorio ( $4-4.5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Le associazioni alleliche con alta PRA per ogni SNP erano sostanzialmente in accordo con le analisi dei fenotipi quantitativi (dati non riportati).

### **Associazione degli aplotipi nel locus SLC12A3 con la PRA.**

Gli SNPs consecutivi 2-5 erano correlati con un indice di correlazione  $D' > 0.85$ , permettendo di trovare un blocco costituito da 3 SNPs (figura 1). Sono stati poi identificati altri aplotipi “block-based” con una frequenza maggiore o uguale al 5%. In rapporto al fenotipo qualitativo, 4 aplotipi erano distribuiti in modo diverso tra i pazienti alta PRA e normale PRA: l'aplotipo AA era meno frequente nel gruppo normale PRA rispetto a quello alta PRA (0.427 vs. 0.601 rispettivamente,  $p = 0.00001$ ), mentre l'aplotipo GA era più frequente nel gruppo normale PRA che in quello alta PRA (0.373 vs. 0.249,  $p = 0.0008$ ).

Usando la PRA come tratto quantitativo, QHAPIPF ha confermato il risultato dell'associazione aplotipica qualitativa del blocco costituito dagli SNP 2-5 ( $\chi^2_4 = 19.3$ ,  $p = 0.00068$ ), con un effetto additivo.

### **Associazione con potenziali confondenti clinici.**

Per escludere il fatto che i risultati ottenuti fossero dovuti a associazioni spurie con confondenti clinici che possono interferire con la regolazione dello stato “volumetrico”, come per esempio lo stato nutrizionale (accertato con BMI, escrezione di Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> delle 24h e creatinina sierica), la funzione renale (accertata con eGFR, Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> sierici), la distribuzione secondo il sesso (stratificazione per sesso), la PA basale e l’età, sono state eseguite le stesse analisi quantitative (QTLSNP) per ogni parametro clinico singolarmente e in tutti i casi non è stata trovata nessuna associazione statisticamente significativa.

## DISCUSSIONE

Nel nostro lavoro riportiamo una analisi esaustiva della struttura di linkage disequilibrium del gene SLC12A3 che codifica il canale del Na<sup>+</sup> “tiazide-sensibile”. Lo studio è stato condotto in una ampia coorte di pazienti ipertesi essenziali geneticamente omogenei, mai sottoposti a trattamento antiipertensivo e sotto introito sodico controllato per tutto il periodo dello studio. La struttura genica è stata valutata in relazione alla risposta alla terapia con idroclorotiazide per otto settimane ed ai livelli circolanti di attività reninica plasmatica come indicatore dello “stato volumetrico” dei pazienti. I nostri risultati hanno indicato che 1. il gene SLC12A3 si estende su 4 blocchi aploipici; 2. tre SNPs nel blocco 1 costituenti un aplotipo individuale sono associati con i livelli di attività reninica basale; 3. altri due SNPs costituenti un altro aplotipo distinto sono associati con i livelli di pressione arteriosa diastolica post-trattamento sia a 4 sia ad 8 settimane; 4. la pressione basale della coorte studiata non si associa a polimorfismi a carico del gene SLC12A3.

In questo studio è stato valutato l'effetto di 15 SNPs nel locus del TSC sia sulla risposta antiipertensiva alla terapia con diuretici tiazidici in trattamento cronico sia sui livelli di PRA intesa come indice di ritenzione sodica. Il presente lavoro sull'associazione del locus TSC con questi fenotipi arricchisce il mosaico, ancora in costruzione, dei geni che regolano la sodio-sensibilità e la risposta antiipertensiva al trattamento con diuretici. I nostri risultati indicano che le variazioni geniche che si associano a caratteri fenotipici diversi -- nel nostro caso la risposta antiipertensiva alla idroclorotiazide e lo stato volumetrico dei pazienti espresso per mezzo dei livelli circolanti di attività reninica plasmatica -- possono essere diverse. Porzioni diverse dello stesso gene, quindi, possono esercitare funzioni regolatrici su fenotipi diversi a seconda di quanto e se in esse siano presenti variazioni a livelli dei singoli SNPs. In particolare i caratteri fenotipici sopra indicati sembrano essere regolati, nella nostra coorte, da due blocchi aploipici distinti.

Un altro dato che riteniamo degno di attenzione è che nella nostra coorte l'effetto del genotipo sulla risposta antiipertensiva alla idroclorotiazide si evidenzia limitatamente alla pressione arteriosa diastolica mentre nessun effetto apprezzabile viene evidenziato sulla pressione sistolica e media. Data la numerosità rilevante della coorte studiata e le caratteristiche favorevoli uno studio di associazione da cui la



coorte stessa è caratterizzata (omogeneità genetica, bilancio sodico stabile e controllato, condizione di ipertensione arteriosa lieve mai trattata) riteniamo che la possibilità di un risultato “spurio” sia estremamente bassa, ancorché esistente.

I polimorfismi a livello del gene SLC12A3 da noi esaminati in relazione ai fenotipi intermedi sopra menzionati vanno ad aggiungersi ad altri polimorfismi a livello di altri geni (angiotensin converting enzyme, alfa-adducina, 11beta-idrossisteroide deidrogenasi, il recettore di tipo 1 dell'angiotensina II, la NO-sintasi endoteliale, subunità 9 e beta3 delle G-Protein) che hanno mostrato una associazione con gli stessi fenotipi valutati nel nostro studio contribuendo così a definire il complesso mosaico poligenico che regola la risposta terapeutica ai diuretici tiazidici nell'ipertensione arteriosa essenziale.

Ulteriori studi funzionali sono comunque richiesti per confermare e finalmente chiarire il ruolo di queste varianti nell'ipertensione sodio-dipendente.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo studio suggeriscono che polimorfismi diversi nel gene del co-trasportatore Na-Cl “tiazide-sensibile” possano svolgere un ruolo nel trattamento dell’ipertensione arteriosa essenziale e che i loro blocchi apolitipici possono regolare sia il riassorbimento di sodio sia la risposta pressoria ai diuretici tiazidici.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW Jr., Scheel KW, Manning RD Jr., Norman RA. Arterial Pressure Regulation: Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension.  
Am J Med. 1972; 52:584–594
- 2) Lifton RP. Molecular Genetics of human blood pressure variation.  
Science 1996; 272: 676-680
- 3) Estevez R, Boettger T, Stein V, Birkenhager R, Otto E, Hildebrandt F, Jentsch T J. Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion.  
Nature 414: 558-561, 2001.
- 4) Gamba G, Saltzberg SN, Lombard M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM, Hebert SC. Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 2749-2753, 1993.
- 5) Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report.  
JAMA. 2003;289:2560-72
- 6) Appel LJ. The verdict from ALLHAT - thiazide diuretics are the preferred initial therapy for hypertension.  
JAMA. 2002;288:3039-42
- 7) Krakoff LR. Diuretics for hypertension.  
Circulation. 2005;10:e127-9
- 8) Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, et al. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension.  
Lancet 1997; 349:1353–1357

- 9) Glorioso N, Manunta P, Filigheddu F, Troffa C, Stella P, Barlassina C, et al. The role of alpha-adducin polymorphism in blood pressure and sodium handling regulation may not be excluded by a negative association study.  
Hypertension 1999; 34:649–654
- 10) Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E. C825 T polymorphism of the G protein beta(3)-subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic.  
Hypertension 2001;37:739–743
- 11) Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E. Effects of endothelial nitric oxide synthase, alpha-adducin, and other candidate gene polymorphisms on blood pressure response to hydrochlorothiazide.  
Am J Hypertens 2003; 16:834–839
- 12) Salt sensitivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications.  
Campese VM.  
Hypertension. 1994 Apr;23(4):531-50.
- 13) Bihorac A, Tezcan H, Ozener C, Oktay A, Akoglu E. Association between salt sensitivity and target organ damage in essential hypertension.  
Am J Hypertens. 2000 Aug;13(8):864-72.
- 14) Brunner HR, Laragh JH, Baer L, Newton MA, Goodwin FT, Krakoff LR, Bard RH, Bühler FR. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke.  
N Engl J Med. 1972 Mar 2;286(9):441-9.
- 15) RF Gillum. Pathophysiology of hypertension in blacks and whites. A review of the basis of racial blood pressure differences  
Hypertension 1979;1;468-475
- 16) Cappello N, Rendine S, Griffo R, Mamei GE, Succa V, Vona G, Piazza A.  
Genetic analysis of Sardinia: I. data on 12 polymorphisms in 21 linguistic domains.  
Ann Hum Genet. 1996;60(Pt 2):125-41
- 17) Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M.  
Nat Rev Genet. 2002 Apr;3(4):299-309.

- 18) Purcell S, Cherny S.S, Plenge and Sham P.C. (2003) Genetic power calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*, 19,149-150.
- 19) Mander A. (2001) Haplotype analysis in population based association studies. *STATA J.*, 1,57-73.
- 20) Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. (2005) Haploview analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21,263-265.
- 21) Nyholt DR. (2001) Genetic case-control association studies – correcting for multiple testing. *Hum. Genet.*, 109,564-565.
- 22) Krawczak M, Boehringer S, Epplen JT. (2001) Correcting for multiple testing in genetic association studies: the legend lives on. *Hum. Genet.*, 109,566-567.

**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche e principali parametri di laboratorio della coorte all'atto dell' inclusione nello studio prima di iniziare il trattamento con idroclorotiazide (HCTZ). I valori sono espressi come media±errore standard. SBP pressione arteriosa sistolica, DBP pressione arteriosa diastolica, MBP pressione arteriosa media; eGFR flusso glomerulare stimato (formula di Cockcroft-Gault); PRA attività reninica plasmatica; Na Ur e K Ur: escrezione di sodio e potassio urinario nelle 24 ore

<b>Variable</b>	<b>Patients (n=418)</b>
Gender (male/female)	269/149
Age (years)	47.1 ± 0.48
Body mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	27.0 ± 0.27
SBP (mmHg)	158 ± 1.04
DBP (mmHg)	105 ± 0.57
MBP (mmHg)	122.5 ± 0.66
Serum Na (mEq/l)	141±2
Serum K (mEq/l)	4.4±0.2
eGFR	91±3
PRA standing (ng Angio I ml <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	1.92 ± 0.06
Na Ur (mEq/24 h)	153±5
K Ur (mEq/24 h)	54±2
SBP (mmHg) 4 weeks HCTZ	142 ± 0.70
DBP (mmHg) 4 weeks HCTZ	93 ± 0.44
MBP (mmHg) 4 weeks HCTZ	109 ± 0.48
SBP (mmHg) 8 weeks HCTZ	139 ± 0.45
DBP (mmHg) 8 weeks HCTZ	91 ± 0.45
MBP (mmHg) 8 weeks HCTZ	107 ± 0.48

**Tabella 2.** Descrizione degli SNPs, se codificanti o no e la loro rispettiva MAF osservata nella coorte in esame.

	Ref SNP	Chr16 position	Intermarker distance	Polymorphism (major/minor)	MAF	HWE (p)	Genotyping success rate %
1	rs1138295	56648892	0	G/A	0.097	0.95	100
2	rs735144	56659321	10429	C/A	0.172	0.43	98.4
3	rs4784732	56669916	10595	C/T	0.370	0.33	96.5
4	rs13306673	56672726	2810	A/G	0.479	0.78	98.4
5	rs2304480	56676685	3959	A/T	0.174	0.84	98.1
6	rs4329913	56680829	4144	A/G	0.457	0.02	98.4
7	rs2289119	56688300	7471	C/A	0.068	0.65	100
8	rs2304483	56693350	5050	C/G	0.170	0.96	98.4
9	rs2278490	56702190	8840	A/G	0.484	0.14	99.7
10	rs5804	56703916	1726	G/A	0.169	0.11	100
11	rs11643718	56708916	5000	C/G	0.247	0.05	100
12	rs2304481	56709132	216	A/T	0.083	0.37	99.7
13	rs2289116	56713687	4555	G/A	0.436	0.84	100
14	rs7204044	56718106	4419	A/G	0.348	0.27	99.7
15	rs9924286	56728208	10102	T/G	0.487	0.64	99.7

**Tabella 3.** L'analisi QTL SNP ha mostrato un effetto additivo significativo ( $p < 0.05$ ) per SNP2, SNP3, SNP4 e SNP5, assumendo un modello genetico codominante.

Genetic model: Codominant

Trait	SNP	N	Additive effect		Dominant effect		Both=0	
			F	Prob>F	F	Prob>F	F	Prob>F
opra	snp1	361	0.03	0.872	1.53	0.218	2.05	0.131
	snp2	365	5.16	0.024**	2.13	0.146	3.73	0.025**
	snp3	364	6.15	0.014**	1.25	0.264	3.64	0.027**
	snp4	364	10.00	0.002**	3.26	0.072*	5.24	0.006**
	snp5	364	3.38	0.067*	0.39	0.532	1.94	0.146
	snp6	366	0.54	0.461	0.16	0.688	0.67	0.514
	snp7	366	1.37	0.243	0.66	0.416	0.92	0.398
	snp8	365	0.06	0.812	0.50	0.481	0.71	0.492
	snp9	366	1.18	0.278	4.08	0.044**	2.36	0.096*
	snp10	365	1.82	0.178	2.08	0.150	1.15	0.319
	snp11	366	0.10	0.748	1.52	0.219	0.77	0.464
	snp12	364	0.40	0.527	0.75	0.386	0.38	0.686
	snp13	366	0.13	0.719	0.92	0.338	0.95	0.387
	snp14	360	0.13	0.716	4.12	0.043**	2.09	0.125
	snp15	365	0.00	0.956	2.54	0.112	1.39	0.251

\* $\leq 0.1$ , \*\* $\leq 0.05$ , \*\*\* $\leq 0.001$

**Legende per le figure:**



### **Figura 1**

Struttura aploipica del gene SLC12A3 nella coorte di pazienti con ipertensione arteriosa essenziale valutata nello studio.

### **Figura 2**

Analisi degli SNPs relativa alla associazione con la pressione arteriosa diastolica (pannello superiore) e con l'attività reninica plasmatica (PRA, pannello inferiore) nella coorte in studio. Le barre eccedenti la linea rossa esprimono la significatività della associazione del singolo SNP con il fenotipo in oggetto.

Figura 1

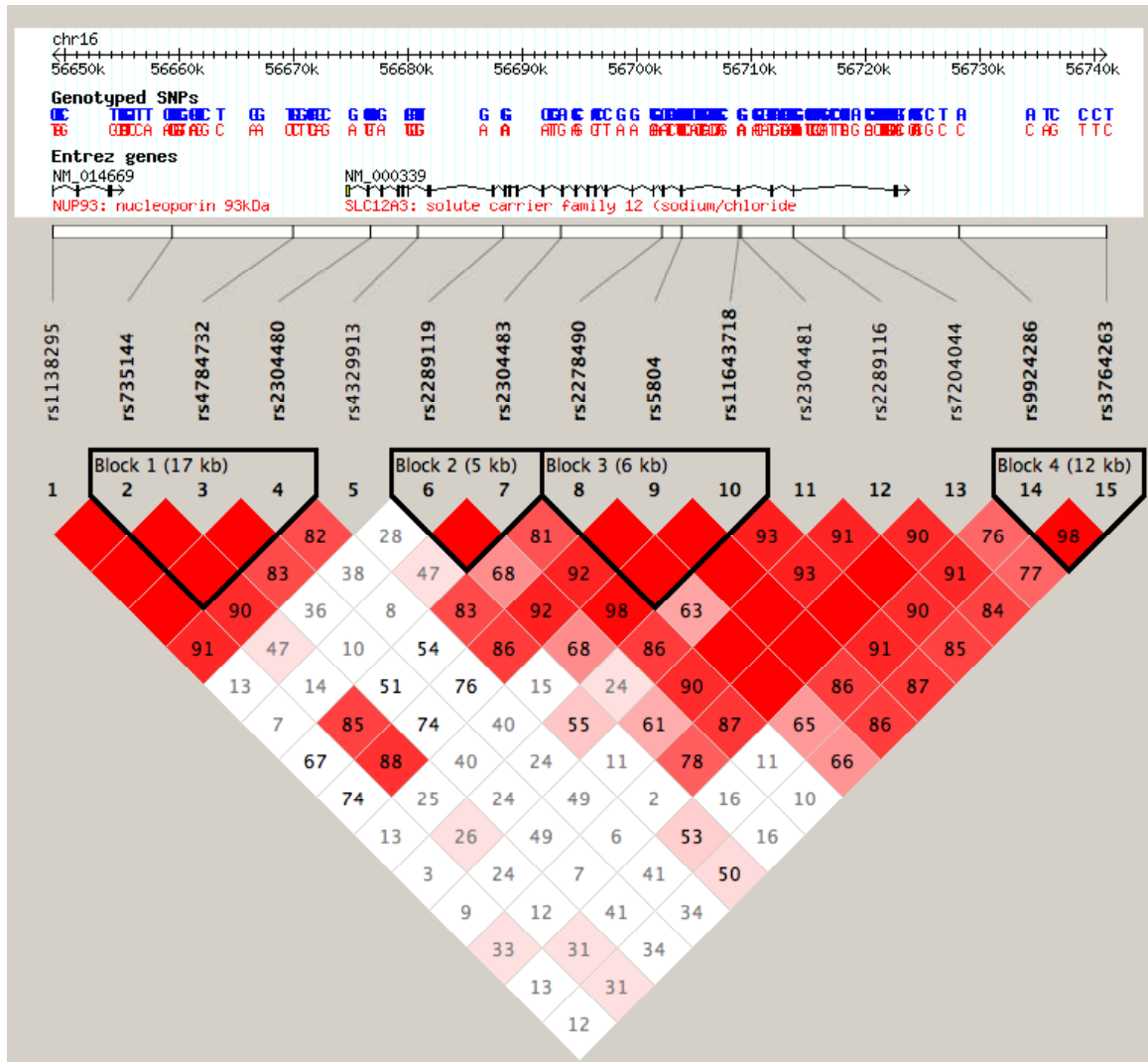


Figura 2

## SNP analysis for $\Delta$ DBP

Silvia Pitzoi, "Il gene del cotrasportatore Na-Cl tiaride sensibile è associato con l'attività reninica plasmatica e l'effetto antiipertensivo dei diuretici" *Fisopatologia*

additive model

0.002

0.007