



Perspectivas da pesquisa na hipertensão arterial

JOSÉ EDUARDO KRIEGER

*Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular —
Departamento de Clínica Médica LIM 13 —
Instituto do Coração — HC-FMUSP*

ORIGEM GENÉTICA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e que contribui, de maneira expressiva, para um grande número de mortes anuais devidas a infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença renal crônica. Apesar de todos os avanços na área da fisiologia cardiovascular, ainda se desconhecem os determinantes primários da hipertensão arterial. Existem várias razões para explicar esse fato, mas fundamentalmente reconhecemos, hoje, que a hipertensão não é uma doença simples com causa única em todos os indivíduos afetados. O estudo dos mecanismos de controle da pressão arterial nas últimas décadas evidenciou grande número substâncias e de sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa e com redundância para garantir a pressão arterial em níveis adequados nas mais diversas situações. Imagina-se, portanto, que a hipertensão arterial resultaria da disfunção dos sistemas de controle de pressão arterial. Entretanto, a complexa interação desses sistemas fisiológicos, assim como as modificações que eles sofrem de fatores ambientais, como, por exemplo, conteúdo de sal na dieta, têm dificultado determinar se as alterações fisiológicas encontradas em pacientes com hipertensão arterial são causadores primários da hipertensão ou simplesmente conseqüências de disfunções primárias ainda desconhecidas.

Mais recentemente, com o advento das técnicas de biologia molecular e a incorporação de abordagens de genética molecular, estamos iniciando um período cujo objetivo é a identificação de mutações gênicas específicas que contribuam para o desenvolvimento da hipertensão arterial. Isso permitirá determinar como defeitos genéticos específicos perturbariam a fisiologia normal, dando origem à hipertensão arterial. Dessa forma, o mecanismo fisiopatológico das várias formas de hipertensão arterial poderá ser esclarecido e, com isso, a oportunidade de identificar precocemente indivíduos de alto risco, o desenvolvimento de formas mais específicas de trata-

mento das causas primárias do processo e a possibilidade de evitar o desenvolvimento da doença por meio de intervenção pré-clínica. Existem várias linhas de evidências indicando que a hipertensão arterial é multigênica e onde influências ambientais têm importância na determinação do fenótipo. Estima-se que 30% a 40% da variação da pressão arterial em uma população sejam devidos a fatores genéticos¹. Portanto, a identificação dos fatores genéticos determinantes da hipertensão arterial será fundamental para esclarecer o processo fisiopatológico da doença. A característica multifatorial e a heterogeneidade etiológica representam os maiores obstáculos para a identificação das alterações genéticas específicas. Apesar dessas dificuldades, progressos importantes estão sendo feitos na área com a utilização de estratégias de genética molecular e o uso de populações de pacientes hipertensos e animais experimentais.

FORMAS MENDELIANAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL

As formas mais simples de hipertensão que podem ser analisadas geneticamente são as chamadas formas mendelianas, ou seja, aquelas nas quais a mutação em um único gene é suficiente para produzir aumento da pressão arterial. Os defeitos associados a essas síndromes têm sido identificados porque a segregação familiar de um alelo simples pode ser feita mais facilmente e também porque a morbidade da hipertensão é proporcional à severidade da doença, e essas formas de hipertensão em geral são severas e não-responsivas à terapêutica convencional. Apesar de essas síndromes serem raras, seu estudo poderá fornecer informações importantes para desenvolvimento de novas formas diagnósticas e de tratamento para esses pacientes. Além disso, permitirá a compreensão de interações entre genes e destes com fatores ambientais, que podem também participar da gênese da hipertensão arterial primária. Acredita-se que, no caso da hipertensão primária, várias dessas vias celulares possam conter defeitos mais discretos e

até mesmo variantes funcionais que, em conjunto, contribuem para a gênese da hipertensão primária. Recentemente, o defeito molecular presente em três dessas síndromes (aldosteronismo remediado por glicocorticóide, síndrome de Liddle e síndrome do aparente excesso de mineralocorticóide), descritas a seguir, foi identificado e em todos os casos a pressão arterial está sendo modificada por meio de uma via comum, que resulta em alteração dos mecanismos de reabsorção de sal e água pelo rim.

O aldosteronismo remediado por glicocorticóide é uma doença autossômica dominante, caracterizada pela produção ectópica de aldosterona pela camada fasciculada da adrenal. É reconhecida pela secreção aumentada do esteroide 18-OX cortisol e seus metabólitos ou pela completa supressão da secreção de aldosterona por glicocorticóides. A hipertensão é de início precoce e se acompanha de baixos níveis de atividade de renina plasmática. Na glândula adrenal normal, a atividade da aldosterona sintase é expressa somente na camada glomerular. A aldosterona é secretada na camada glomerular pela ação da angiotensina II, enquanto o ACTH controla a produção de cortisol pela camada fasciculada da adrenal. Estudos moleculares demonstraram que existe uma duplicação gênica nos indivíduos portadores dessa síndrome. O gene responsável pelo aldosteronismo remediado por glicocorticóide está localizado no cromossomo 8, onde se localizam também o gene que codifica a aldosterona sintase, responsável pela biossíntese da aldosterona, e o gene da 11- β -hidroxilase, que está envolvido na biossíntese do cortisol. O gene duplicado que aparece nesses indivíduos é resultante de uma recombinação aberrante, chamada "crossing-over" incompleto. Essa anormalidade resulta na formação de um gene quimérico, que contém o promotor (região que possui as seqüências sinalizadoras que ligam e desligam o gene, controlando sua expressão) da 11- β -hidroxilase e a região codificadora (que vai dar origem à seqüência de aminoácidos da proteína) da aldosterona sintase. Em consequência disso, a proteína aldosterona sintase, que participa da síntese de mineralocorticóides, é agora regulada positivamente pelo ACTH. O aumento na secreção de aldosterona está associado à retenção de água e sal, à expansão do volume plasmático e ao desenvolvimento de hipertensão. Uma vez realizado o diagnóstico, o tratamento pode ser feito por modificação farmacológica da expressão do gene pela administração de glicocorticóides, inibindo a secreção do ACTH e, portanto, desligan-

do a expressão do gene quimérico e/ou inibidores da ação de mineralocorticóides^{2,3}.

A síndrome de Liddle representa outra forma de hipertensão arterial humana de herança autossômica dominante, caracterizada por supressão da atividade de renina plasmática e baixos níveis de aldosterona, ao contrário do aldosteronismo remediado por glicocorticóide. A hipertensão desses pacientes é mediada por reabsorção excessiva de sal e água no néfron distal. Estudos genéticos indicaram que o gene responsável por essa síndrome está ligado a uma região do cromossomo 16. Nessa região cromossômica estão localizados dois genes que codificam as subunidades β e γ dos canais de sódio epiteliais sensíveis à amilorida. O canal de sódio é formado por três subunidades (α , β e γ), essenciais para a atividade normal do canal. A reabsorção de sódio pelo canal é normalmente regulada pela aldosterona. Estudos moleculares em pacientes com síndrome de Liddle identificaram mutações nos genes β e γ . Essas mutações resultam em deleções ou introdução de um segmento peptídico curto, rico em prolina, na porção carboxiterminal intracelular das subunidades β e γ . O resultado dessas alterações gênicas é o aumento de atividade do canal, levando a excessiva reabsorção de sal e água, independentemente da ação de mineralocorticóides com desenvolvimento de expansão de volume e hipertensão^{2,3}.

A síndrome do aparente excesso de mineralocorticóide é uma doença autossômica recessiva, caracterizada por hipertensão de moderada a severa, que também se manifesta precocemente e está associada à razão aumentada dos metabólitos cortisol:cortisona urinários. Essa síndrome é decorrente da estimulação excessiva dos receptores de mineralocorticóides, mas, ao contrário do aldosteronismo remediado por glicocorticóide, os pacientes apresentam baixos níveis circulantes de aldosterona. Estudos moleculares identificaram mutação na enzima 11- β -hidroxisteróide desidrogenase renal, que resulta em perda da atividade e, portanto, o cortisol não é convertido em cortisona. Em condições normais, o cortisol apresenta atividade mineralocorticóide muito pequena, porque é rapidamente convertido em cortisona (não apresenta atividade mineralocorticóide), pela ação dessa enzima. Na síndrome do aparente excesso de mineralocorticóide, a enzima é deficiente e o cortisol em abundância ativa receptores mineralocorticóides renais. A clonagem do gene que codifica a enzima 11- β -hidroxisteróide desidrogenase permitiu identificar as mutações responsáveis pela perda

da atividade enzimática^{2,3}.

Os estudos dessas diferentes síndromes ilustram como a identificação molecular do defeito leva à compreensão dos mecanismos celulares associados a disfunções complexas, como a hipertensão arterial. Nesses três exemplos, a via final comum para o desenvolvimento da hipertensão foi a retenção de sal e água, apesar de diferentes genes estarem envolvidos. É importante ressaltar que, mesmo nessas síndromes onde um único defeito é capaz de elevar a pressão arterial por uma via comum, existem particularidades importantes que determinam a terapêutica específica.

HIPERTENSÃO ARTERIAL PRIMÁRIA

A causa do aumento da pressão arterial na maioria dos pacientes permanece desconhecida e por isso a doença é denominada hipertensão arterial primária. Acredita-se que essa síndrome, na realidade, seja poligênica e que as influências ambientais desempenhem papel importante na manifestação final do fenótipo. Devido a esse alto grau de complexidade, várias abordagens estão correntemente sendo utilizadas para identificar os genes que participam da gênese da hipertensão arterial. Essas abordagens presumem que a variação interindividual da pressão arterial é, pelo menos em parte, determinada geneticamente.

Estudos de associação ou de casos controles comparam se a frequência de determinado alelo polimórfico está alterada em populações de indivíduos normotensos "versus" hipertensos. Nesse modelo, imagina-se que o marcador molecular sendo testado está em desequilíbrio de ligação com o alelo responsável pelo traço genético. Ou seja, o marcador molecular está sobre ou tão próximo ao alelo procurado que eles são segregados conjuntamente com frequência maior que aquela esperada ao acaso.

A investigação de variantes moleculares em genes candidatos é outra abordagem que vem sendo utilizada, onde as variantes funcionais de vários genes são identificadas por métodos que permitem a análise de muitos indivíduos, como, por exemplo, o método de análise do polimorfismo conformacional de uma fita simples de DNA (SSCP) ou de seqüenciamento de DNA de forma automatizada. A alteração de DNA correspondente a variantes funcionais pode ser identificada facilmente e sua significância funcional, avaliada de várias maneiras.

Por exemplo, podem-se empregar estudos de associação semelhantes aos mencionados an-

teriormente para testar se as variantes funcionais estão associadas à hipertensão mais frequentemente que na população normal. Alternativamente, empregam-se estudos de ligação, onde o impacto das variantes funcionais é analisado por meio da segregação das variantes em heredogramas familiares contendo indivíduos hipertensos. É importante salientar que, devido à complexidade característica da hipertensão arterial, como, por exemplo, a heterogeneidade etiológica, à possibilidade de penetração incompleta e a modelos de herança desconhecidos, vêm sendo utilizados métodos alternativos aos estudos de ligação tradicionais. Um desses métodos é a análise de pares de irmãos afetados. Finalmente, essas diferentes análises são complementadas por estudos de expressão funcional, utilizados para testar o efeito fisiológico direto das variantes funcionais em células em cultura ou até mesmo no contexto do animal inteiro por meio do desenvolvimento de modelos animais geneticamente manipulados (transgênicos, "knockout", "knockin" e congênicos). Foram citados, neste artigo, três exemplos de sucesso empregando essa abordagem para identificação dos genes responsáveis por formas mendelianas de hipertensão. Mais recentemente, essa abordagem forneceu evidência de ligação de variante do gene do angiotensinogênio e hipertensão arterial essencial em indivíduos de origem caucasiana. A variante T235, onde treonina substitui metionina no códon 235, está associada a níveis circulantes mais elevados de angiotensinogênio⁴. Além disso, a hipótese de que níveis circulantes elevados de angiotensinogênio podem influenciar a pressão arterial foi elegantemente testada em um estudo⁵, onde foram produzidos camundongos contendo 0, 1, 2, 3 e 4 cópias do gene do angiotensinogênio por meio de técnicas de recombinação homóloga. Nesses animais, os níveis de angiotensinogênio circulante e os níveis de pressão arterial são proporcionais ao número de cópias do gene, demonstrando, assim, a relação causal entre elevação da pressão arterial e dos níveis de angiotensinogênio em camundongos.

Outra abordagem, complementar às discutidas acima, baseia-se na utilização de animais de experimentação com substrato genético uniforme, onde cruzamentos genéticos controlados podem ser feitos para maximizar os resultados de estudos de ligação genética. Esses estudos de "total genome scan" baseiam-se na utilização de marcadores moleculares distribuídos por todos os 21 cromossomos do rato e que permitem a identificação da origem parental das diversas

regiões cromossômicas. Dessa forma, pode-se criar uma geração de ratos que contêm distribuição aleatória do conteúdo genético proveniente de uma cepa de animal normotenso e de uma cepa de animal geneticamente hipertenso. A caracterização fenotípica desses animais, como, por exemplo, a pressão arterial sob diversas situações, pode então ser correlacionada com a herança de regiões cromossômicas específicas da cepa de ratos geneticamente hipertensos e/ou com a falta de regiões cromossômicas da cepa normotensa. Em nosso laboratório, investigamos cerca de 220 animais provenientes do inter cruzamento da cepa normotensa Brown Norway com a cepa geneticamente hipertensa SHR⁶. Com a utilização da análise de 24 fenótipos relacionados a variáveis cardiovasculares e 336 marcadores moleculares, identificamos cinco regiões cromossômicas (2 no cromossomo 2 e 1 nos cromossomos 4, 8 e 16) associadas à elevação da pressão arterial desses animais após sobrecarga salina. Essas cinco regiões devem conter genes associados ao desenvolvimento de hipertensão nesses animais. Com o objetivo de testar essa hipótese, estamos desenvolvendo linhagens de animais congênicos que contêm o "background" genético do animal SHR, exceto pela região mapeada que está sendo transferida do animal normotenso. Esse processo é feito por meio de retrocruzamentos e da seleção dos animais que contêm a região a ser transferida do animal normotenso e o restante do genoma do animal hipertenso. Presentemente, estamos desenvolvendo a sétima geração dessas diferentes linhagens

e espera-se que o processo esteja completo em uma ou duas gerações. A análise desses animais permitirá testar diretamente se aquelas regiões contêm os genes que determinam o desenvolvimento da hipertensão no SHR e, também, permitirá que estudos de interação gene-gene e gene-fatores ambientais possam ser realizados "in vivo".

Portanto, a utilização das técnicas de biologia molecular e as abordagens da genética molecular estão permitindo, pela primeira vez, que se explore de forma sistemática os fatores primários determinantes da hipertensão arterial. É importante enfatizar que esse conjunto de técnicas não somente ampliou nossa capacidade analítica para identificar genes candidatos, mas também criou a oportunidade de modificar o genoma de uma célula ou de um organismo para testar as hipóteses no contexto complexo do animal inteiro. Essas abordagens fazem uso indiscriminado de experimentação animal e estudos humanos por meio de técnicas fisiológicas e bioquímicas para cruzamento de informações que levem à identificação de defeitos primários, ao reconhecimento de vias celulares e às conseqüências fisiológicas que advêm dessas alterações. O desenvolvimento desse conhecimento permitirá que sejam criados meios de identificar os indivíduos hipertensos precocemente assim como formas terapêuticas que atuem de modo eficaz na causa primária, além de dar oportunidade para intervenções pré-clínicas que reduzam a morbidade e a mortalidade associadas à hipertensão arterial essencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. New York: Raven Press; 1995. p.67-88.
2. Lifton RP. Genetic determinants of human hypertension. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:8545-51.
3. Williams GH, Fisher NDL. Genetic approach to diagnostic and therapeutic decisions in human hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens 1997;6:199-204.
4. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. Cell 1992;71:169-80.
5. Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Haganan JR, Hodgin JB, Best CF, et al. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:2735-9.
6. Schork NJ, Krieger JE, Troillet MR, Franchini KG, Koike G, Krieger EM, et al. A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation. Gen Res 1995;5:164-72.