Biologia e genética molecular aplicadas ao diagnóstico e tratamento da hipertensão

Novos paradigmas, antigos problemas

Alexandre C. Pereira, José Eduardo Krieger

Resumo

Hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um dos mais importantes fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Aqui, enfatiza-se como abordagens baseadas em biologia e genética molecular podem aumentar o conhecimento dos fatores determinantes do nível pressórico de um indivíduo, assim como das variáveis preditoras de uma boa resposta à terapêutica escolhida para seu tratamento. Abordam-se alguns dos aspectos metodológicos existentes e quais os problemas atuais para a

interpretação dos dados gerados a partir dessas abordagens. Espera-se que, em um futuro não muito distante, algoritmos para o diagnóstico e a determinação de um perfil de resposta terapêutica mais específicos poderão estar disponíveis a clínicos e pacientes. O entendimento dos fatores genéticos relacionados a esses perfis será de fundamental importância para que tanto a morbidade quanto a mortalidade causada pela hipertensão arterial possam ser minimizadas por modalidades não apenas terapêuticas, mas também preventivas, mais específicas e custo-efetivas.

Palavras-chave: Biologia molecular; Genética; Hipertensão.

Recebido: 07/10/00 – Aceito: 10/11/00

Rev Bras Hipertens 8: 105-13, 2001

Introdução

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um dos mais importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares. Apesar de importantes avanços no entendimento de vários aspectos de sua fisiopatologia e da existência de diversas modalidades terapêuticas altamente efetivas, o número de pacientes hipertensos ainda

sem diagnóstico ou com tratamento ineficaz é ainda alarmante. Na última década, as taxas ajustadas para idade de acidentes vasculares cerebrais aumentaram nos Estados Unidos e a taxa de declínio na incidência de doenças cardiovasculares diminuiu. Ainda, tanto a incidência de doença renal crônica quanto de insuficiência cardíaca aumentaram. Não resta dúvida de que um dos maiores fatores

contribuindo para este cenário é o controle inadequado dos níveis pressóricos em populações humanas.

Este texto enfatiza novas abordagens no entendimento dos fatores determinantes do nível de pressão arterial (PA) de um indivíduo, assim como das variáveis preditoras de uma resposta favorável à terapêutica escolhida para seu tratamento. De posse desses dados, pesquisadores e

Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular
Departamento de Clínica Médica
Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

médicos poderão melhor direcionar esforços preventivos e terapêuticos, tanto para indivíduos como para populações e, com isso, diminuir o impacto da hipertensão arterial e das doenças cardiovasculares na morbi-mortalidade mundial.

Definindo hipertensão

A pressão arterial de um indivíduo ou população é um traço quantitativo altamente variável. Em estudos populacionais, a distribuição da PA se assemelha a uma distribuição normal, sendo levemente desviada para a direita. Ainda existe uma correlação positiva entre os níveis de PA de um indivíduo e a incidência de doenças cardiovasculares, renais e mortalidade no mesmo, mesmo que esse indivíduo tenha sua PA na faixa dita de normalidade. Uma vez que não existe um nível definido a partir do qual os valores de PA passam a aumentar o risco cardiovascular, a definição de hipertensão arterial é arbitrária, definida operacionalmente por razões práticas para avaliação de risco e tratamento de um indivíduo.

Dessa maneira, o JNC VI (Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment Of High Blood Pressure) define e classifica hipertensão em adultos com base na média entre 2 medidas de PA sistólica e diastólica em pelo menos 3 visitas ao médico. Com a utilização dessa definição, estima-se que aproximadamente 20% da população mundial seja classificada como hipertensa¹.

Dessa maneira, já se delimita o primeiro problema no estudo dos definidores da hipertensão arterial. Como utilizar uma definição operacional, não necessariamente vinculada a alterações fisiopatológicas específicas, para a determinação dessas mesmas alterações? Ainda, a despeito da

prevalência de hipertensão arterial ser aproximadamente constante nas mais diferentes populações humanas, a frequência dessa condição varia dependendo de uma série de fatores como idade, etnia, padrões geográficos, sexo ou *status* socioeconômico. Novamente aqui se delimita um novo obstáculo a esse estudo, trazendo à tona o problema da validade externa de cada um desses estudos (isto é, indivíduos hipertensos de uma população podem não possuir um mesmo conjunto de alterações do que hipertensos de outra população, ainda que a média pressórica de ambos os grupos seja exatamente igual).

Dessa maneira, a hipertensão arterial pode ser considerada uma doença complexa, multifatorial, na qual diferentes pacientes podem apresentar diferentes fatores causais para o traço, podendo estes ser tanto ambientais quanto genéticos²².

Como então dissecar um traço tão complexo, delimitando de maneira específica cada um desses componentes?

Fatores etiológicos para hipertensão arterial: definindo a equação

Vários fatores implicados no aumento da pressão arterial já foram claramente identificados. São exemplos destes: obesidade, resistência à insulina, consumo aumentado de álcool, consumo aumentado de sal (pelo menos em indivíduos sal-sensíveis), idade, sedentarismo, estresse, baixo consumo de potássio e cálcio, entre outros². O reconhecimento desses fatores de risco pode levar a um diagnóstico mais precoce, instalação de medidas de prevenção não-farmacológicas ou um melhor tratamento quando da condição já instalada.

Ainda, postula-se que variações genéticas podem contribuir na deter-

minação dos níveis de pressão arterial de um indivíduo. Esse conceito se deve não apenas à herdabilidade elevada da pressão arterial definida como um fenótipo ou ao caráter quantitativo de sua distribuição populacional, mas também ao grande impulso que trabalhos envolvendo modelos animais de hipertensão, estes sim, geneticamente determinados, deram ao estudo desses determinantes. Não se deve subestimar, ainda, a contribuição desses fatores genéticos na própria definição dos outros fatores de risco, ditos ambientais, como diabetes, obesidade ou mesmo consumo de álcool. Outro aspecto importante que deve ser considerado nesse complexo modelo são as possíveis interações, aditivas ou mesmo sinérgicas, entre fatores de risco ambientais com fatores de risco geneticamente determinados⁶.

É justamente a elucidação de quais são as variáveis genéticas importantes nessa enorme equação que pode ajudar médicos a melhor diagnosticarem e tratarem seus pacientes. Dessa maneira, definir que a hipertensão de um indivíduo se deve sobremaneira à presença de resistência à insulina, obesidade, idade e à interação dessas condições com outros tantos fatores de risco genéticos pode ser muito mais importante no futuro para o manejo clínico de um paciente do que conceituá-lo unicamente como hipertenso essencial.

Herdando níveis de pressão arterial

A identificação de variantes gênicas (alelos) que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão é ainda complicada pelo fato de ser a hipertensão arterial como fenótipo o resultado de uma série de outros fenótipos intermediários. Ou seja, a hipertensão arterial de um indivíduo

nada mais é do que o resultado final do sistema de homeostase de uma série de sistemas fisiológicos operantes no momento da medida de PA.

Nesse sentido, toma fundamental importância a capacidade de dissecarmos um fenótipo complexo, desmembrando-o em sucessivos fenótipos mais simples (e muitas vezes mais específicos) no intuito de, operacionalmente, melhor definirmos as variáveis atuantes nesses chamados fenótipos intermediários^{4,25}. Assim, o estudo dos determinantes de outros sistemas fisiológicos relacionados à homeostase pressórica toma proporções cada vez mais relevantes. O estudo do sistema nervoso autônomo, de hormônios vasopressores/vasodilatadores, estrutura e função cardíaca e dos vasos, função renal, homeostase de líquidos, assim como vários outros, poderia dessa maneira auxiliar na definição dos determinantes gênicos do fenótipo inicial, mais complexo, nesse caso a pressão arterial.

Mas, quais as evidências de que realmente existem determinantes genéticos para a pressão arterial?

Diversos estudos familiares demonstraram a agregação familiar de valores de hipertensão arterial, tanto entre irmãos quanto entre pais e filhos⁵. Existe uma associação mais importante entre os níveis pressóricos de irmãos biológicos, comparados ao de irmãos adotivos. Ainda, estudos com gêmeos mostram uma concordância maior entre gêmeos monozigóticos que com gêmeos dizigóticos, outra evidência de que os níveis de pressão arterial são, em parte, geneticamente determinados. Aplica-se aqui a mesma observação antes realizada. Esses estudos podem, ainda, subestimar a colaboração de fatores genéticos uma vez que padrões comportamentais como obesidade ou uso excessivo de álcool também podem ser modulados por fatores genéticos.

Outra evidência para a existência de fatores genéticos determinando os

níveis de pressão arterial de um indivíduo é a existência de uma série de modelos animais para hipertensão arterial. Aqui, classicamente se destacam os modelos animais existentes em ratos, como o SHR, o SHR-SP ou o Dahl, onde características ligadas à hipertensão arterial são geneticamente determinadas⁷. Importantes avanços no entendimento da fisiopatologia e dos determinantes dos níveis pressóricos têm se devido a investimentos em estudos com abordagens de localização e isolamento gênico nesses modelos animais⁸.

Talvez, no entanto, a maior evidência de que variantes genéticas podem influenciar os níveis pressóricos de um indivíduo advenha do estudo de famílias que apresentam segregação clássica (nos padrões mendelianos) dos valores de pressão arterial. Uma série de mutações em diferentes genes participantes do sistema de homeostase de sal e água já foram caracterizadas em famílias com formas monogênicas de hipertensão arterial (isto é, famílias que apresentavam padrão de herança mendeliano para o valor de pressão arterial de seus membros)²³.

Definindo os determinantes moleculares na hipertensão: aspectos metodológicos

Tradicionalmente a identificação de genes relacionados a doenças vem sendo realizada através de modelos de análise genéticos descritos já no início da década de 1950, mas que tiveram crescimento exponencial de seus usos e aplicações com o advento do Projeto Genoma Humano.

A identificação de um gene causador de determinada patologia passa, fundamentalmente, por uma de duas

abordagens distintas: a localização deste através de clonagem posicional, no qual um gene mutante causador de uma doença é identificado a partir de sua posição no genoma, ou a inferência da associação deste com uma doença através de estudos associativos, nos quais genes candidatos a causadores da doença são testados em diferentes estudos em busca de uma associação positiva com a mesma. A seguir, descrevem-se de forma resumida as principais características e usos desses dois tipos de estudo.

Doenças monogênicas e estudos de ligação

Quando estudamos uma doença que segue os padrões de herança genética descritos por Mendel, dizemos que esta doença é mendeliana quanto a sua herança genética. Ainda, denominamos doenças monogênicas aquelas que são causadas por apenas um gene mutante. As doenças mendelianas, por serem monogênicas, podem ter seu padrão de herança definido através da análise do heredograma de família afetada pela mesma, ou através do estudo de várias famílias em estudos de segregação. Uma vez definido o tipo de herança genética (autossômica dominante, recessiva ou ligada ao X), o pesquisador pode se utilizar de métodos de pesquisa mais específicos na busca do gene causador dessa patologia.

Esses métodos, denominados paramétricos, são exemplificados pelos estudos da ligação.

O fenômeno de ligação genética deriva do fato de que genes coexistem num mesmo cromossomo. Em humanos, existem 22 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais. Durante a meiose, os dois cromossomos de um par segregam, de forma que apenas um cromossomo de cada par é transmitido

para um gameta. Os vários cromossomos segregam de forma independente, assim os alelos localizados em diferentes cromossomos também segregam de forma independente. Isso significa que dois traços definidos por alelos em diferentes cromossomos serão herdados de forma independente numa família. Da mesma maneira, dois traços definidos por alelos que estejam localizados num mesmo cromossomo podem não ser herdados independentemente um do outro, e sim serem transmitidos juntos ao gameta. Teoricamente, poderíamos supor que dois alelos no mesmo cromossomo sempre seriam transmitidos juntos aos gametas uma vez que estão no mesmo cromossomo. Contudo, na disjunção meiótica os cromossomos não permanecem intactos: *crossing-over*, ou recombinação gênica, ocorre entre cromossomos homólogos de um mesmo par. Quando um evento de recombinação ocorre entre dois *loci* genômicos situados contiguamente num mesmo cromossomo, esses serão segregados de maneira independente, como se estivessem em cromossomos diferentes. A frequência com que eventos de recombinação ocorrem entre dois *loci* depende fundamentalmente da distância cromossômica que separa esses dois *loci*: quanto maior a distância, maior a chance que ocorra recombinação entre ambos. Assim, para dois *loci* próximos, eventos de recombinação serão raros, para dois *loci* distantes num cromossomo, praticamente uma certeza. Denominamos, ainda, fração de recombinação à proporção de todos os gametas que tiveram recombinação gênica entre dois *loci* de interesse. Dessa maneira, se dispusermos de um número grande de *loci* no genoma, para os quais conhecemos a exata localização, poderemos, no contexto de uma família, estudar a fração de recombinação entre estes *loci* conhecidos (marca-

dores genéticos) com relação ao *locus* em que se encontra o gene mutante causador da doença, ou traço, que pretendemos estudar. É a este estudo que denominamos estudo de ligação (se a fração de recombinação entre um marcador genético e o *locus* da doença for pequena, ambos devem estar próximos, ligados quanto à segregação, no genoma e a clonagem posicional deste passa a ser possível).

De maneira simplificada, em estudos de ligação procuramos estudar o padrão de segregação do gene mutante e sua conseqüente identificação através da construção de densos “mapas” genéticos de cada membro da família. Após a construção desses mapas procuramos por determinada região dos mapas que estejam segregando junto com a doença estudada. Em outras palavras, procuramos por uma região que esteja presente apenas nos indivíduos afetados dessa família e ausente nos não-afetados. É nessa região cromossômica que o gene mutante causador da doença deverá se localizar.

Em um segundo momento, procede-se ao estudo detalhado da região identificada em busca da identificação precisa do gene mutado (clonagem posicional).

Estudos de ligação, apesar de descritos e propostos já nos anos 50, tiveram seu uso historicamente limitado pela falta de marcadores genômicos definidos. Eram limitados a marcadores essencialmente fenotípicos como sexo e polimorfismos protéicos. Essas limitações foram recentemente superadas com a descrição de um grande número (milhares) de marcadores genéticos, tarefa especialmente facilitada pelo Projeto Genoma Humano. Durante os últimos anos, esses marcadores foram utilizados com grande sucesso em estudos de ligação de um grande número de doenças mendelianas. Em cardiologia não foi diferente: as formas

familiares de cardiomiopatias hipertrófica e dilatada, doenças cardíacas congênitas, síndrome de Marfan e as arritmias congênitas foram definidas geneticamente com o uso de estudos de ligação.

Algumas limitações, contudo, existem quanto ao uso desse tipo de estudo. Em primeiro lugar é necessário que se conheça o tipo de herança envolvido; são geralmente necessárias grandes famílias afetadas pela doença (o que nem sempre é possível devido à raridade e alta mortalidade encontrada em muitas dessas); fenômenos como a penetrância reduzida, a heterogeneidade genética ou a variabilidade na expressão clínica de determinado defeito podem também reduzir a aplicabilidade desses métodos. Ainda assim, uma vez superados esses problemas, estudos de ligação são o desenho de estudo de escolha na abordagem genética de doenças monogênicas⁹.

Formas mendelianas de hipertensão: o canal epitelial de sódio e a síndrome de Liddle como modelo

Em 1963, Liddle et al. descreveram uma síndrome autossômica dominante associada à hipertensão moderada a severa, hipocalemia, alcalose metabólica e níveis plasmáticos suprimidos de renina e aldosterona. A correção tanto da hipertensão quanto da hipocalemia, através do uso de amiloride, sugeria que um dos potenciais candidatos a ser o causador da síndrome de Liddle, como passou a ser conhecida, era o canal epitelial de sódio (CENa) renal. Em 1994, Shimkets et al. foram os primeiros a descrever mutações na região carboxi-terminal da subunidade beta do CENa associadas à síndrome de Liddle.

Através da regulação via aldosterona e vasopressina, o canal epitelial de sódio (CENa) localizado no néfron distal é um dos determinantes primários da absorção renal deste íon. Este canal composto por 3 subunidades é membro da superfamília de genes dos canais epiteliais de sódio, que inclui mais de 20 proteínas homólogas. As proteínas desta superfamília compartilham uma estrutura característica: dois domínios transmembrana interligados por uma alça extracelular e com domínios carboxi e amino-terminais localizados no intracelular. A alça extracelular é o local de acoplamento da droga amiloride e a região carboxi-terminal um *hot spot* para mutações que alteram a função do canal em humanos. No néfron distal, o CENa é uma proteína heterotetrâmica, composta por 3 diferentes subunidades homólogas: duas subunidades alfa, separadas por uma subunidade beta e outra gama, sendo todas necessárias para o funcionamento normal da proteína.

Análises de outras famílias já identificaram mutações em seqüências ricas em prolina das porções carboxi-terminais das subunidades beta e gama. Estudos de mutagênese permitiram analisar algumas dessas mutações e mostrar que estas levam a proteínas constitutivamente ativadas. Ainda, várias evidências sugerem que mutações causadoras da síndrome de Liddle levam tanto à expressão de um número maior de canais de sódio quanto a um aumento da probabilidade de abertura dos mesmos. Dois mecanismos são propostos para explicar esse fenômeno. Mutações em regiões ricas em prolina nas subunidades beta e gama, mas não alfa, podem levar a uma diminuição da endocitose dessas proteínas, aumentando assim suas meias-vidas. Ainda, a regulação da meia-vida dessas proteínas parece estar ligada a ubiquitinação de porções carboxi terminais das subunidades alfa e gama do CENa.

Esse processo depende da ação de ubiquitin ligase de uma outra proteína, Nedd4. Embora mutações em Nedd4 ainda não tenham sido descritas como personagens de desbalanços da homeostase pressórica, alterações em CENa no sítio de ação desta enzima parecem contribuir para o fenótipo de aumento de meia-vida observado na síndrome de Liddle.

A síndrome de Liddle pode ser tratada através da restrição salina e do uso de amiloride (um diurético inibidor seletivo deste canal de sódio). Estudos com pacientes portadores desta síndrome podem trazer maiores esclarecimentos para o fenômeno da hipertensão sal-sensível, assim como definir formas terapêuticas ainda mais específicas para esta e outras formas de hipertensão arterial^{10,11}.

Hipertensão arterial essencial como doença complexa: interações gene-ambiente e estudos de associação

A epidemiologia genética tem se tornado progressivamente mais importante no estudo dos determinantes moleculares das doenças complexas. Denominam-se doenças complexas aquelas que têm sua gênese e desenvolvimento dependente de uma série de diferentes fatores genéticos e ambientais. Assim, diferentemente das doenças monogênicas descritas anteriormente, as doenças complexas são causadas por um grande número de alelos gênicos e por diferentes interações desses alelos com influências ambientais. O conceito da interação gene-ambiente torna-se central nesses tipos de estudo e no acesso das causas dessas doenças em populações humanas.

Uma série de diferentes tipos de estudo vem sendo proposta e utilizada

nesse sentido. Uma vez que a preocupação central desses estudos não é a de se localizar a mutação causadora da doença, nem de se estudar seu padrão de herança, e sim a de procurar melhor entender a etiologia e patofisiologia dessas doenças através da quantificação do risco de indivíduos em uma população, modelos de análise não-paramétrica vêm sendo preferencialmente utilizados. Esses modelos, diferentemente dos estudos paramétricos (por exemplo, estudos de ligação), não pressupõem o conhecimento do tipo de herança genética da doença *a priori*, sendo, assim, ideais para o estudo de doenças como o diabetes, a hipertensão e a aterosclerose que, apesar de se agregarem em famílias, não têm um modelo de segregação facilmente determinável. Outra vantagem do uso de modelos não-paramétricos na análise de dados é que estes oferecem ao pesquisador uma maior sensibilidade para a identificação de alelos que aumentem apenas moderadamente o risco relativo de um indivíduo ao desenvolvimento de uma patologia. Uma vez que se acredita serem as doenças complexas causadas por um número grande de alelos deletérios que, individualmente, confeririam um risco pouco aumentado ao indivíduo portador do mesmo, o estudo dessas doenças através de estudos paramétricos provavelmente não identificaria esses alelos como de risco.

Estudos epidemiológicos clássicos no contexto das interações gene-ambiente

Se entendermos as interações gene-ambiente como o controle genético da sensibilidade de um indivíduo às exposições ambientais, e fatores genéticos como uma das

características de seus portadores, então essas interações poderiam ser analisadas através do uso de desenhos de estudos epidemiológicos clássicos como estudos de coorte e caso-controle.

Em um estudo tipo caso-controle, os marcadores genéticos postulados a participarem em algum aspecto da doença estudada e fatores ambientais supostamente relevantes são estudados individualmente como preditores independentes de doença, assim como de maneira conjunta. Nos estudos de coorte, as exposições ambientais e os fatores de risco genéticos são mensurados para todos os indivíduos no início do estudo e depois durante avaliações subsequentes.

Apesar desses estudos terem se tornado bastante populares, principalmente por serem já de uso corrente nas investigações de epidemiologia clínica, bastante sensíveis e permitirem a análise de diferentes tipos de exposição e interações gênicas com o desenvolvimento de determinada patologia, eles apresentam alguns problemas metodológicos que têm diminuído o interesse de pesquisadores pelo seu uso.

Dentre esses se destacam: a difícil escolha de controles (as frequências dos diferentes marcadores estudados são altamente dependentes do grupo étnico e da estrutura populacional estudada); erros na quantificação da exposição ambiental (inerente a todos os tipos de estudos epidemiológicos, quando do estudo das interações gene-ambiente esse tipo de erro pode produzir grandes erros na estimação das interações estudadas, uma vez que essas são dependentes do valor total da exposição, assim como dos valores relativos ao tempo de exposição e período da exposição, por exemplo, intra-útero); erro na classificação genotípica (enquanto não se definirem todas as variantes funcionais de um gene numa população, pode se estar pesquisando as variantes funcionais “erradas”, ou seja, aquelas que não

conferem risco, apesar do gene em questão ser envolvido na gênese da patologia); tamanho das amostras (muitas vezes grandes amostras são necessárias para determinados tipos de estudo, principalmente quando os alelos estudados são pouco frequentes e o tipo de exposição também pouco frequente ou apenas moderado)⁹.

Estudos epidemiológicos não-tradicionais

Dúvidas quanto à escolha do melhor grupo-controle para estudos do tipo caso-controle levaram ao desenvolvimento de uma série de abordagens não-tradicionais nos estudos de associação genética. Destacam-se 3 diferentes abordagens que permitem contornar os problemas de variação populacional e étnica quanto aos marcadores genéticos utilizados: estudos que somente utilizam casos; estudos do tipo caso-familiar e estudos do tipo caso-irmão (*sib-pair*).

Em estudos que se utilizam apenas de casos, não existe um grupo controle e o pesquisador parte do princípio de que o genótipo de um indivíduo e sua exposição ambiental são variáveis independentes. Várias limitações existem nesse tipo de desenho: (1) a escolha dos casos é ainda sujeita aos biases usuais dessa escolha como em estudos caso-controle; (2) a assumpção de que as exposições são independentes do genótipo não é válida para todos os genes; (3) esse tipo de desenho não permite ao investigador que este avalie os efeitos ou da exposição ou do genótipo de forma independente; (4) assim como em estudos do tipo caso-controle, a associação encontrada pode ser apenas por desequilíbrio de ligação (no qual o alelo estudado não é o “causador” da associação e sim apenas “próximo” geneticamente do alelo realmente importante).

Em estudos que utilizam casos e familiares, estes últimos são utilizados como grupo-controle na procura de marcadores genéticos que poderiam estar associados a aumento do risco para o desenvolvimento da doença. O método requer o conhecimento das informações genotípicas dos pais dos indivíduos casos. Em sua forma mais simples, esse tipo de teste compara os alelos transmitidos de indivíduos afetados com os alelos não transmitidos. Os alelos não transmitidos formam um grupo de alelos-controle. A análise é conduzida de forma condicional aos genótipos dos pais, com cada “trio” familiar sendo considerado uma unidade à parte. Uma das limitações desse método é que o grupo controle pode não ser representativo da população em risco para a patologia estudada, especialmente quando alguns dos genótipos estudados podem interferir com a capacidade reprodutora. Ainda, a necessidade dos pais dos indivíduos casos pode se constituir em grande empecilho para o uso desse método, especialmente quando se estudam patologias crônicas, mais prevalentes numa faixa etária mais avançada.

O terceiro tipo de método epidemiológico não-tradicional aqui descrito é o de caso-irmão. Neste tipo de análise o investigador determina se cada unidade caso-irmão compartilha 0, 1 ou 2 alelos em um *locus* de interesse. A segregação mendeliana ocorre de forma aleatória e a chance de que dois irmãos compartilhem 0, 1 ou 2 alelos é, respectivamente, de 25%, 50% e 25%. Desvios dessa distribuição falam a favor de que existe uma ligação entre os alelos estudados e a doença. Diferente dos desenhos previamente discutidos, esse modelo testa para a existência de ligação, ou seja, adiciona ao modelo de análise associativa o fator segregação, ponto central dos estudos em genética.

Uma série de variantes aos modelos propostos vem sendo desenvolvida.

Uma maior capacidade técnica para a geração de dados genotípicos associada a um maior poder estatístico advindo de novos algoritmos e modelos matemáticos prometem revolucionar a área do estudo das doenças complexas e auxiliar não apenas em seu entendimento, mas também tratamento e prevenção^{12,13}.

Determinantes moleculares da hipertensão arterial essencial ou primária

Apesar dos vários avanços na caracterização molecular de diversas formas monogênicas de hipertensão, as alterações genéticas responsáveis pelo componente herdado dos níveis de pressão arterial nos casos de hipertensão essencial são ainda desconhecidas. Estudos em famílias sugerem que uma série de fenótipos intermediários podem estar diretamente relacionados com hipertensão, como alto contra-transporte sódio-lítio, baixa excreção urinária de caliceínas, altas concentrações plasmáticas de insulina, alto índice de massa corpórea, entre outros. Jeunemaitre et al. foram os primeiros a reportar uma associação de um polimorfismo gênico com hipertensão arterial numa população humana. Esse polimorfismo se encontra no gene do angiotensinogênio e é a substituição de uma timidina por uma citosina na posição 704 do gene. Essa alteração gênica leva a uma alteração de aminoácido na proteína, caracterizada pela substituição de uma metionina por uma treonina na posição 235. A presença dessa alteração se associa com uma maior concentração plasmática de angiotensinogênio. Essa variante parece se encontrar em desequilíbrio de ligação com outra alteração, esta segunda presente na região promotora do gene. Estudos com o promotor do gene sugerem que a presença desta segunda alteração muda a taxa

basal de transcrição do gene, podendo, assim, justificar o achado de níveis plasmáticos mais altos de angiotensinogênio nas pessoas portadoras da variante¹⁴.

Muitos estudos já foram publicados, desde então, sobre a associação desse polimorfismo e hipertensão arterial em diversas populações humanas, apresentando resultados bastante discordantes¹⁵⁻¹⁷. Primeiramente, esse polimorfismo parece explicar apenas uma pequena fração da variação de PA (aproximadamente 6%). Ainda, as concentrações plasmáticas de angiotensinogênio, apesar de maiores em pessoas com o polimorfismo, claramente se sobrepõem às de pessoas normais. Dessa forma, ainda não existe consenso sobre qual o papel dessa variante na determinação dos níveis de PA em humanos.

O caso do angiotensinogênio expõe algumas das principais dificuldades na definição dos determinantes genéticos primários da pressão arterial. Uma série de polimorfismos e mutações em outros genes como da enzima conversora de angiotensina I, receptores beta adrenérgicos, alfa-aduccina, subunidades de proteína G, fator atrial natriurético e receptor de insulina já foram também associados inicialmente ao desenvolvimento de pressão arterial, mas subseqüentemente não confirmados em outros estudos. Espera-se que abordagens mais robustas de delineamento metodológico, assim como a utilização de uma maior capacidade de geração de dados, possam ajudar a vencer alguns desses novos desafios²¹.

Tratamento da hipertensão arterial: moldando a terapêutica ao paciente

O objetivo do tratamento anti-hipertensivo é o de reduzir o risco cardiovascular de um indivíduo e, assim, as taxas

de morbidade e mortalidade. Em um paciente, a decisão de iniciar tratamento é determinada por uma série de fatores, como a magnitude da elevação da PA, o acometimento de órgãos-alvo e a presença de outros fatores de risco cardiovascular. Nos últimos anos, uma série de alterações nos paradigmas desse tratamento ocorreram. Essas mudanças foram refletidas em consensos recentes como o JNC VI e o Guideline da OMS-Sociedade Internacional de Hipertensão. Nestes, sensíveis alterações puderam ser percebidas: (1) os critérios para início de tratamento não dependem apenas do nível de PA mas, como já citado, do risco cardiovascular total do indivíduo em questão; (2) um tratamento mais agressivo é recomendado para alguns pacientes em particular, como diabéticos ou pacientes com insuficiência renal crônica; (3) houve uma melhor definição da importância da abordagem múltipla de vários fatores de risco em simultâneo. Todas essas alterações remetem, no entanto, a uma mudança mais importante, também enfatizada em ambos os consensos: a busca pela individualização no tratamento¹⁸.

Nesse sentido, a identificação dos fatores ambientais e genéticos responsáveis pela elevação na PA e pelo acometimento de órgãos-alvo ou morte por eventos cardiovasculares em um indivíduo pode levar à definição de formas farmacológicas e não-farmacológicas de prevenção, tratamento e até mesmo cura da hipertensão mais específica.

Atualmente, por exemplo, existem evidências de que alterações no estilo de vida como diminuição de peso, menor consumo de álcool ou aumento no consumo de potássio e cálcio podem levar a reduções significativas nos níveis de PA. No entanto, essas alterações são particularmente mais eficientes em alguns indivíduos. Ainda, atualmente já se identificam indivíduos com maior ou menor res-

posta a determinada modalidade terapêutica anti-hipertensiva¹⁹. A identificação precisa de quais indivíduos irão responder a qual tipo de intervenção se configura no cerne desse novo paradigma.

Farmacogenética e hipertensão

Quais fatores podem determinar o risco individual de desenvolvimento de uma reação adversa, um efeito colateral ou a falha terapêutica de uma medicação?

Fatores já citados para explicar a resposta individual de um indivíduo a determinada modalidade terapêutica são as interações entre diferentes drogas, a idade do paciente, outras doenças associadas (hipertensão + diabetes, hipertensão + osteoporose, hipertensão + dislipidemia, por exemplo) e o estilo de vida do paciente (tabagismo ou etilismo, por exemplo). No entanto, ainda mais importante na determinação individual da resposta são fatores herdados capazes de alterar a cinética e dinâmica de uma série de drogas²⁰. Assim, variações genéticas em genes responsáveis por enzimas metabolizadoras de drogas, receptores de drogas e proteínas transportadoras

de drogas já foram associadas com a variabilidade individual na resposta ou toxicidade às drogas. Se variações gênicas existem em determinada população numa frequência maior que 1%, essas variações são denominadas polimorfismos gênicos. Polimorfismos gênicos podem explicar por que determinado indivíduo se encontra em maior risco para uma pior resposta ou ao desenvolvimento de uma reação adversa a determinada droga.

As primeiras descrições de reações adversas a drogas relacionadas a variantes de enzimas metabolizadoras datam da década de 1950. Curiosamente, a identificação genética de uma dessas enzimas (uma das enzimas participantes do sistema metabolizador do citocromo P450 – CYP2D6) foi auxiliada pelo estudo de pacientes que apresentavam hipotensão ortostática com o uso da droga anti-hipertensiva debrisoquina. Atualmente, um grande número de variantes gênicas em enzimas metabolizadoras, receptores e transportadores já foram descritos e vêm sendo estudados como determinantes da resposta à terapia anti-hipertensiva²⁴.

São exemplos, nesse sentido, as variantes gênicas no gene da alfa aduccina, associadas à resposta a diuréticos tiazídicos; o polimorfismo

D/I do gene da enzima conversora de angiotensina I, associado à resposta a terapêutica com inibidores da mesma enzima; variantes da enzima do citocromo P450 CYP2C9 e um efeito anti-hipertensivo menor do losartan e variações no gene da N-acetiltransferase e o desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico secundário ao uso de hidralazina. Estes e novos exemplos certamente irão se beneficiar de esforços conjuntos na geração de novos dados genéticos em larga escala e do desenvolvimento de novas abordagens matemáticas e computacionais que vêm sendo desenvolvidas. Ressalte-se, no entanto, que esses estudos devem ser alvo das mesmas críticas antes colocadas ao estudo dos determinantes primários da pressão arterial e ainda necessitam reprodução em estudos de maior dimensão.

Ainda assim, espera-se que num futuro não muito distante algoritmos para o diagnóstico e o traçado de um perfil de resposta terapêutica mais específicos poderão estar disponíveis a clínicos e pacientes e que com isso tanto a morbidade quanto a mortalidade causada pela hipertensão arterial poderão ser minimizadas por modalidades não apenas terapêuticas, mas preventivas mais específicas e custo-efetivas.

Abstract

Molecular biology and genetics in the diagnosis and treatment of hypertension new paradigms, old problems

Essential hypertension is one of the main cardiovascular risk factor worldwide. This text emphasizes how molecular biology and genetics can add important insights into the main determinants of human blood pressure, as well as, into the predictive factors related to the therapeutic response of

different antihypertensive treatment modalities. Methodological aspects are discussed and potential bias in the interpretation of current work in the field is also highlighted. It is awaited that in the near future algorithms for the diagnosis and prediction of the therapeutic response will be available for clinicians and hypertensive patients. The understanding of the genetic variables related to these algorithms will be of paramount importance in reducing the morbidity and mortality caused by hypertension and in the development of more specific and cost-effective therapeutic and preventive modalities.

Keywords: Molecular biology; Genetics; Hypertension.

Referências

1. The Sixth Report of The Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Asch Intern Med* 157: 2413-46, 1997.
2. Carretero OA, Oparil S. Essential Hypertension. Part I: Definition and etiology. *Circulation* 101: 329-35, 2000.
3. Guo SW, Lange K. Genetic mapping of complex traits: promises, problems, and prospects. *Theoretical Population Biology* 57: 1-11, 2000.
4. Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J et al. Renin-Angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 35: 512-7, 2000.
5. Havlik RJ, Garrison RJ, Feinleib M, Kannel WB, Castelli WP, Mcnamara PM. Blood pressure aggregation in families. *Am J Epidemiol* 110: 304-12, 1979.
6. Harrap SB. Hypertension: genes versus environment. *Lancet* 344: 169-71, 1994.
7. Warden CH, Fisler JS. Integrated methods to solve the biological basis of common diseases. *Methods: a companion to methods in enzymology* 13: 347-57, 1997.
8. Jacob HJ, Krieger JE, Dzau VJ, Lander ES. Genetic dissection of hypertension in experimental animal models. In *Molecular genetics and gene therapy of cardiovascular diseases*. Mockrin SC (ed.). New York, 293-319, 1996.
9. Pereira AC, Krieger JE. Diabete e aterosclerose: até onde a genética molecular pode nos levar? *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 5: 1025-32, 1998.
10. Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 272: 676-80, 1996.
11. Gabers DL, Dubois SK. The molecular basis of hypertension. *Annu Rev Biochem* 68: 127-55, 1999.
12. Risch N. Evolving methods in genetic epidemiology. II. Genetic linkage from an epidemiologic perspective. *Epidemiol Rev* 19: 24-32, 1997.
13. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-48, 1994.
14. Corvol P, Jeunemaitre X. Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. *Endocr Rev* 18: 662-77, 1997.
15. 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* 31(3): 725-9, 1998.
16. Vasku A, Soucek M, Znojil V, Rihacek I, Tschoplova S, Strelcova L, Cidl K, Blazkova M, Hajek D, Holla L, Vacha J. Angiotensin I-converting enzyme and angiotensinogen gene interaction and prediction of essential hypertension. *Kidney Int* 53(6): 1479-82, 1998.
17. Kiema TR, Kauma H, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, Kesaniemi YA, Savolainen MJ. Variation at the angiotensin-converting enzyme gene and angiotensinogen gene loci in relation to blood pressure. *Hypertension* 28(6): 1070-5, 1996.
18. Carretero OA, Oparil S. Essential Hypertension. Part II: Treatment. *Circulation* 101: 446-53, 2000.
19. He Jiang, Whelton PK. Selection of initial antihypertensive drug therapy. *Lancet* 356: 1942-3, 2000.
20. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286: 487-91, 1999.
21. Krieger JE. New contributions to clinical hypertension from molecular biology. *Curr Opin Cardiology* 13: 312-8, 1998.
22. Dzau VJ, Krieger JE, Hutchinson H. Molecular mechanisms in hypertension. In *Molecular Cardiovascular Medicine*. Edited by Haber E. New York, Scientific American, 225-41, 1995.
23. Cusi D, Bianchi G. A primer on the genetics of hypertension. *Kidney International* 54: 328-42, 1998.
24. Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 356: 1667-71, 2000.
25. Gratze G, Fortin J, Labugger R, Binder A, Kotanko P et al. Beta adrenergic receptor variants affect resting blood pressure and agonist induced vasodilation in young adult caucasians. *Hypertension* 33: 1425-30, 1999.