

FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO

EDUARDO MOACYR KRIEGER, MARIA CLÁUDIA IRIGOYEN, JOSÉ EDUARDO KRIEGER

Unidade de Hipertensão e Laboratório de Biologia Molecular
Instituto do Coração — HC-FMUSP

Endereço para correspondência: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 — CEP 05403-000 — São Paulo — SP

A hipertensão arterial primária resulta de alterações nos sistemas de controle da pressão arterial. Várias substâncias endógenas participam de maneira integrada nesse complexo sistema, que tem por objetivo manter a homeostasia cardiovascular. No indivíduo hipertenso, a interação de fatores genéticos e fatores ambientais leva ao desequilíbrio desses sistemas, que resulta no aumento da pressão arterial associado a maior incidência de eventos de morbidade e mortalidade. Esse quadro desfavorável pode ser modificado rapidamente com a utilização de estratégias que têm por objetivo, de forma integrada, identificar os

determinantes genéticos em populações de pacientes e/ou modelos experimentais. Por meio de técnicas de biologia molecular, o papel de cada um desses genes candidatos em processos celulares pode ser investigado. Esses avanços permitirão o reconhecimento precoce de indivíduos com risco de desenvolver a doença até mesmo antes que ela se manifeste. Isso deve propiciar estratégias de intervenção pré-clínica e desenvolvimento de terapias mais específicas e eficazes.

Descritores: hipertensão arterial, genética molecular, mapeamento gênico, epidemiologia molecular.

(Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 1999;1:1-7)

RSCESP (72594)-813

EQUILÍBRIO DOS FATORES PRESSORES E DEPRESSORES

Como é bem sabido, os determinantes da pressão arterial são o débito cardíaco e a resistência periférica e qualquer alteração em um ou outro, ou em ambos, interfere na manutenção dos níveis pressóricos normais. Diferentes mecanismos de controle estão envolvidos não só na manutenção (componente tônico) como na variação momento-a-momento (componente fásico) da pressão arterial, regulando o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluido dentro e fora dos vasos e o débito cardíaco. Os complexos mecanismos pressores e depressores interagem e se equilibram; quando o equilíbrio se rompe com predominância dos fatores pressores, ocorre a hipertensão primária⁽¹⁾. Essa ruptura pode ser provocada e/ou acelerada pelos fatores ambientais, como excesso de sal na dieta e estímulos psicoemocionais, entre outros. Na hipertensão estabelecida, a maioria dos controladores está altera-

da, sendo difícil estabelecer quais os que tiveram papel preponderante no desencadeamento e mesmo na manutenção das cifras elevadas de pressão arterial. O aumento da resistência periférica é o fator mais importante na hipertensão e, portanto, os mecanismos que promovem a redução do calibre das arteríolas merecem especial atenção. Eles atuam basicamente na contração da musculatura que regula a luz do vaso ou na espessura da musculatura, ocupando maior ou menor parte do lúmen, ou em ambos. Admite-se, também, que a redução da luz ocorra não só pela hipertrofia da parede como também por um remodelamento. Na Figura 1 observam-se as diferentes formas de aumentar a resistência periférica na hipertensão. No remodelamento, há redução dos diâmetros interno e externo, sem modificação da massa.

Fatores funcionais, como a atividade simpática modulada pelas aferências de diferentes reflexos e por substâncias vasopressoras ou vasodepressoras circulantes ou produzidas pelas próprias células da

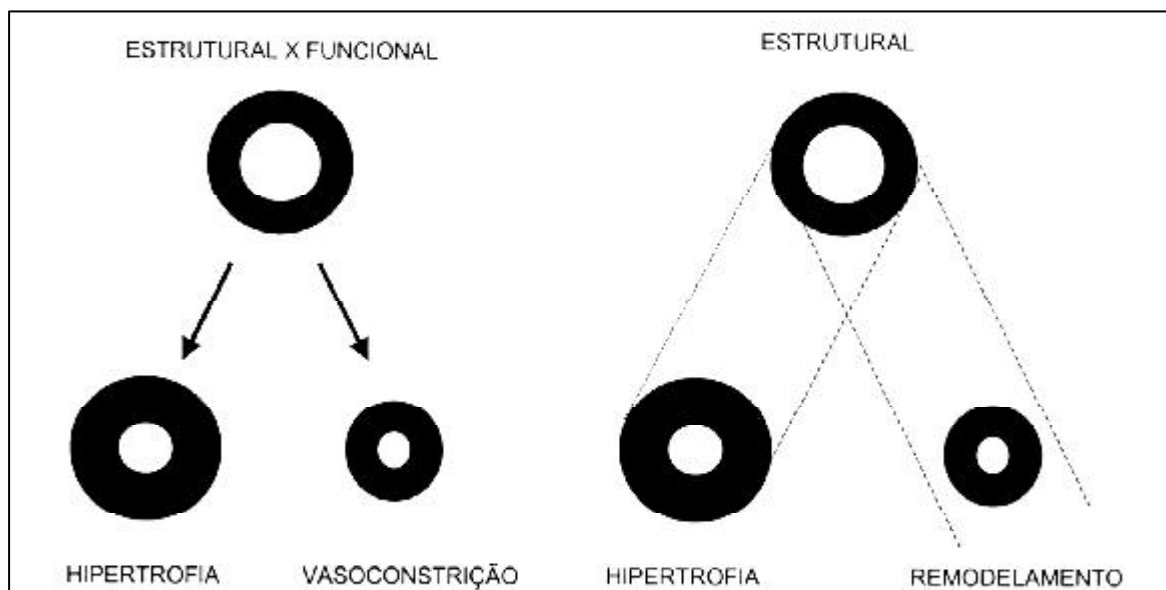


Figura 1. O aumento da resistência periférica pode ocorrer por vasoconstrição (funcional) ou por hipertrofia da camada média muscular (estrutural). A alteração estrutural pode ocorrer por remodelamento (redução de todos os diâmetros, sem alteração da massa).⁽²⁾

musculatura lisa, ou endoteliais, são os determinantes da variação do tônus vascular. Além disso, há evidências de que diferentes hormônios pressores (angiotensina II, norepinefrina, vasopressina, insulina) contribuem para o estímulo ao crescimento da parede vascular, enquanto as substâncias vasodilatadoras têm efeito oposto, inibindo a proliferação celular. Portanto, a hipertensão primária resultaria da ruptura do equilíbrio entre os fatores vasoconstritores, que também promovem o crescimento da musculatura vascular, e os fatores vasodilatadores, que também inibem o crescimento da musculatura vascular (Fig. 2).

Na fase inicial, poderia predominar o fator funcional (vasoconstrição ativa), enquanto na fase de manutenção ocorreriam as alterações estruturais. O encadeamento temporal dos dois mecanismos possivelmente varia de indivíduo para indivíduo e é difícil saber, em determinada fase da hipertensão, qual a importância relativa de cada um deles.

Como a hipertensão resulta do desequilíbrio na atuação dos diferentes reguladores, é considerada uma doença multifatorial. Também pode ser considerada uma verdadeira síndrome naqueles casos em que vem acompanhada de obesidade, alteração no metabolismo lipídico e glicídico e resistência à insulina (Fig. 3), quando geralmente existe hipertonía simpática produzindo elevações da frequência e do débito cardíaco.

BIOLOGIA MOLECULAR E HIPERTENSÃO

A hipertensão é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e contribui de maneira expressiva para grande número de mortes devidas a infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença renal crônica. Apesar de todos os avanços na área da fisiologia cardiovascular, ainda não se conhecem os determinantes primários da hipertensão arterial. Existem várias razões para explicar esse fato, mas fundamentalmente reconhece-se, 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 de substâncias e de sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa e com redundância para manter a pressão arterial em níveis adequados, nas mais diversas situações fisiológicas. Admite-se, portanto, que a hipertensão arterial resulta 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 causadoras primárias da hipertensão ou simplesmente conseqüência de disfunções primárias ainda desconhecidas.

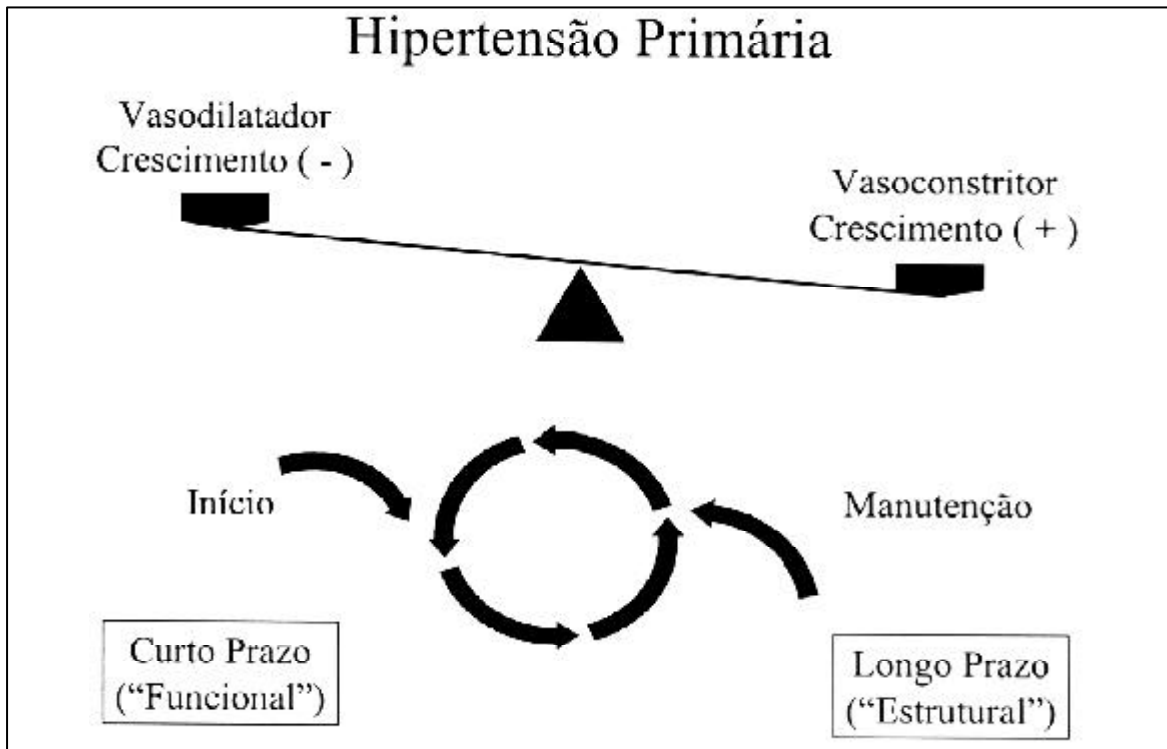


Figura 2. A hipertensão primária provavelmente se inicia por alterações funcionais (vasoconstrição) e se estabiliza por alterações estruturais, combinadas em grau variado com as funcionais.⁽³⁾

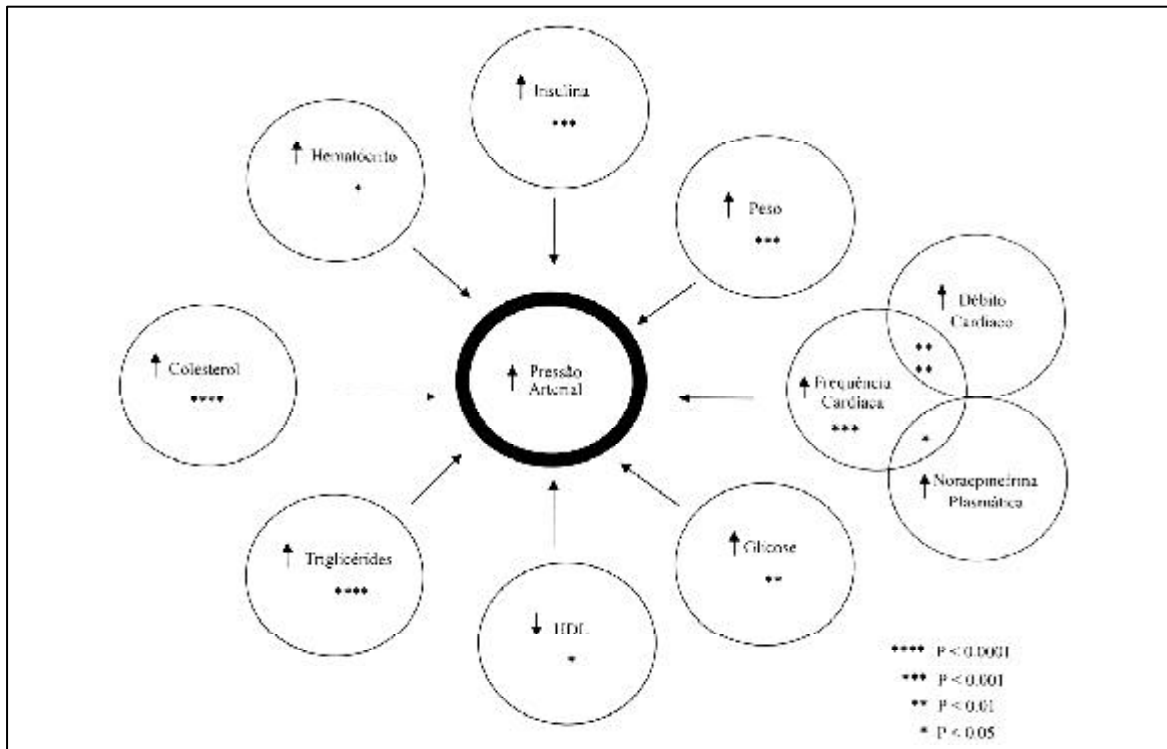


Figura 3. Diagrama demonstrando a associação entre a elevação da pressão arterial e as alterações de outros fatores, observada em 452 homens, no estudo Tecumseh, Michigan.⁽⁴⁾

O advento das técnicas de biologia molecular e a incorporação de abordagens de genética molecular vêm permitindo buscar-se a identificação de mutações gênicas específicas que contribuem 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 identificação precoce de indivíduos de alto risco, o desenvolvimento de formas mais específicas de tratamento das causas primárias do processo e, ainda, a possibilidade de evitar o desenvolvimento da doença por meio de intervenção pré-clínica. Existem várias evidências indicando que a hipertensão arterial é multigênica e que as 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 genéticos⁽⁶⁾. 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, estão sendo feitos progressos importantes 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. Essas formas de hipertensão em geral são severas e não respondem à terapêutica convencional. Apesar de essas síndromes serem raras, elas fornecem informações importantes não somente para o desenvolvimento de novas formas diagnósticas e de tratamento, mas, também, para a compreensão de interações entre genes e destes com fatores ambientais que podem participar da gênese da hipertensão. Recentemente, foi identificado o defeito molecular presente em três dessas síndromes 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:

- aldosteronismo remediado por glicocorticóide (GRA);
- síndrome de Liddle;
- síndrome do aparente excesso de mineralocorticóide (AME).

Aldosteronismo remediado por glicocorticóide (GRA)

É uma doença autossômica dominante, caracterizada pela produção ectópica de aldosterona pela camada fasciculada da adrenal. É reconhecida pela secreção aumentada do esteróide 18-OX cortisol e seus metabólitos, ou pela completa supressão da secreção de aldosterona por glucocorticóides. A hipertensão tem 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 GRA 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-beta-hidroxilase, envolvido na biossíntese do cortisol. O gene duplicado que aparece nesses indivíduos é resultante da 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-beta-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 a retenção de água e sal, expansão do volume plasmático e desenvolvimento de hipertensão. Feito o diagnóstico, o tratamento pode ser feito por modificação farmacológica da expressão do gene pela administração de glicocorticóides, inibindo a secreção do ACTH, portanto desligando a expressão do gene quimérico e/ou inibidores da ação de mineralocorticóides^(6,7).

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 GRA. 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 ligada a uma região do cromossomo 16. Nessa região cromossômica estão localizados dois genes que codificam as subunidades beta e gama dos canais de sódio epiteliais sensíveis à amilorida. O canal de sódio é formado por três subunidades (alfa, beta e gama), 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 beta e gama. Essas mutações resultam em deleções ou introdução de um segmento peptídeo curto, rico em prolina, na porção carboxiterminal intracelular das subunidades beta e gama. 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^(6,7).

Síndrome do aparente excesso de mineralocorticóide (AME)

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 GRA, os pacientes apresentam baixos níveis circulantes de aldosterona.

Estudos moleculares identificaram uma mutação na enzima 11-beta-hidroxisteróide desidrogenase renal, que resulta em perda da atividade; 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 AME, a enzima é deficiente e o cortisol em abundância ativa receptores mineralocorticóides renais. A clonagem do gene que codifica a enzima 11-beta-hidroxisteróide desidrogenase permitiu identificar as mutações responsáveis pela perda da atividade enzimática^(6,7).

Os estudos dessas diferentes síndromes ilustra como a identificação molecular do defeito leva à com-

preensão dos mecanismos celulares associados a disfunções complexas, como a hipertensão arterial. Nesses três exemplos, a via final comum para o desenvolvimento da hipertensão é 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 ESSENCIAL

A causa do aumento de pressão arterial na maioria dos pacientes permanece desconhecida e, por isso, é denominada hipertensão arterial essencial. Acredita-se que a síndrome na realidade seja poligênica e que as influências ambientais desempenhem papel importante na manifestação 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. As abordagens presumem que a variação interindividual da pressão arterial é determinada, pelo menos em parte, geneticamente.

Estudos de associação ou de casos controles

Esses estudos 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.

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 acima para testar se as variantes funcionais estão associadas à hipertensão mais freqüentemente que na população normal. Alternativamente, empregam-se estudos de liga-

ção, onde o impacto das variantes funcionais é analisado pela segregação das variantes em heredogramas familiares contendo indivíduos hipertensos. É importante salientar que, devido à complexidade característica da hipertensão arterial, como a heterogeneidade etiológica, a possibilidade de penetração incompleta e de modelos de herança desconhecidos, outros métodos alternativos aos estudos de ligação tradicionais vêm sendo utilizados. Um desses métodos é a análise de pares de irmãos afetados. Finalmente, essas diferentes análises são complementadas por estudos de expressão funcional, que são utilizados para testar o efeito fisiológico direto das variantes funcionais em células em cultura ou até mesmo no contexto do animal inteiro pelo desenvolvimento de modelos animais geneticamente manipulados (transgênicos, "knockout", "knockin" e congênicos). Já foram citados anteriormente três exemplos de sucesso empregando essa abordagem para identificação dos genes responsáveis por formas mendelianas de hipertensão. Mais recentemente, essa abordagem forneceu evidência de existir uma ligação de variante do gene do angiotensinogênio com a hipertensão arterial essencial, em indivíduos de origem caucasiana. A variante T235, onde a treonina substitui metionina no códon 235, está associada a níveis circulantes mais elevados de angiotensinogênio[®]. Além disso, a hipótese de que níveis circulantes elevados de angiotensinogênio podem influenciar a pressão arterial foi elegantemente testada[®]. Nesse estudo, 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 a elevação da pressão arterial e os 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 pelos 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 si-

tuações, pode ser correlacionada com a herança de regiões cromossômicas específicas da cepa de ratos geneticamente hipertenso e/ou a falta de regiões cromossômicas da cepa normotensa. Em nosso laboratório, foram investigados cerca de 220 animais provenientes do inter cruzamento da cepa normotensa Brown Norway com a cepa geneticamente hipertensa SHR⁽¹⁰⁾. Com a utilização da análise de 24 fenótipos relacionados a variáveis cardiovasculares e 336 marcadores moleculares, foram identificadas cinco regiões cromossômicas (duas no cromossomo 2 e uma 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 seleção dos animais, que contêm a região a ser transferida do animal normotenso e o restante do genoma do animal hipertenso. Atualmente, estamos desenvolvendo a sétima geração dessas diferentes linhagens, esperando-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; permitirá, também, 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 só ampliou nossa capacidade analítica para identificar genes candidatos, como 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 conjuntamente de experimentação animal e de 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 consequências fisiológicas que advêm dessas alterações. O desenvolvimento desse conhecimento permitirá que sejam desenvolvidos meios para identificar precocemente os indivíduos hipertensos, formas terapêuticas que atuem de forma eficaz na causa primária, e a oportunidade para intervenções pré-clínicas que reduzam a

morbidade e a mortalidade associadas à hipertensão arterial essencial. Além disso, a utilização dessas técnicas está tendo grande impacto no conhecimento dos vários sistemas de controle da pressão arterial, como o do sistema renina-angiotensina, onde já se conhece a

intimidade de ação da angiotensina, levando à resposta contrátil da célula muscular (funcional) e à cadeia de reações que modifica o painel controlador dos genes que comandam a síntese de proteínas responsáveis pelo crescimento da musculatura (estrutural).

HYPERTENSION: PHYSIOPATHOLOGY AND PERSPECTIVES

EDUARDO MOACYR KRIEGER, MARIA CLÁUDIA IRIGOYEN, JOSÉ EDUARDO KRIEGER

Hypertension results from abnormalities of the control systems that regulate blood pressure. A number of endogenous biologically active substances interact in a complex but integrated manner to maintain cardiovascular homeostasis. In the hypertensive patient, the interplay of genetic and environmental factors leads to disequilibrium of these systems and hypertension ensues. This picture is about to be changed with the use of well defined strategies aimed at identifying the genetic determinants of hypertension in experimental animals and affected populations. The specific role of candidate genes in cell pathways can then be explored by molecular biology techniques to clarify the underlying mechanisms responsible for development and maintenance of hypertension. These advances shall enable early identification of individuals at risk. In addition, it raises opportunities for pre-clinical intervention and rational development of new forms of therapy.

Key words: primary hypertension, molecular genetics, genetic mapping, molecular epidemiology.

(Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 1999;1:1-7)

RSCESP (72594)-813

REFERÊNCIAS

1. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev* 1982;62:347-504.
2. Krieger EM, Franchini KG, Krieger JE. Fisiopatogenia da hipertensão arterial. *Medicina — Ribeirão Preto* 1996;29:181-92.
3. Krieger JE. New contribution to clinical hypertension from molecular biology. *Curr Opin Cardiol* 1998;13:312-6.
4. Julius S. Sympathetic hyperactivity and coronary risk in hypertension. *Hypertension* 1993;21:886-93.
5. 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;pp.67-88.
6. Lifton RP. Genetic determinants of human hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8545-51.
7. Williams GH, Fisher ND. Genetic approach to diagnostic and therapeutic decisions in human hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997;6:199-204.
8. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992;71:169-80.
9. Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, et al. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2735-9.
10. Schork NJ, Krieger JE, Troillet MR, et al. A biometrical genome search in rats reveals the multigenic basis of blood pressure variation. *Gen Res* 1995;5:164-72.