

Cerco à matadora silenciosa

Projeto avança na determinação das bases genéticas da hipertensão e abre caminho para métodos de prevenção e terapias mais eficientes no futuro

Um grupo de pesquisadores paulistas está avançando de modo promissor na identificação dos componentes genéticos da hipertensão, que devem permitir, no futuro, a determinação precoce do risco de desenvolvimento de patologias e de morte a elas relacionada, em cada paciente que apresente elevação em seus níveis de pressão arterial. Mais que isso, o conhecimento das bases genéticas da hipertensão promete o desenvolvimento de métodos preventivos e de terapias muito mais eficientes do que os adotados hoje para controlar a doença e, o que é muito importante, métodos adequados para cada caso – porque as causas e os efeitos da hipertensão variam muito de pessoa para pessoa.

O grupo, formado por 11 pesquisadores, entre biólogos moleculares, fisiologistas e médicos clínicos, sob a liderança do professor Eduardo Moacyr Krieger, chefe da Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração, o InCor, participa de uma espécie de cerco genético internacional à hipertensão, com o projeto *Bases fisiológicas da hipertensão: estudo integrado*. Trata-se de um temático financiado pela FAPESP, que até o momento lhe destinou cerca de US\$ 650 mil. Desenvolvido a partir de 1995, o projeto conta, em alguns estudos específicos,

com a colaboração de pesquisadores do Medical College de Wisconsin, das universidades de Harvard e da Carolina do Norte, e já apresentou alguns resultados muito concretos à comunidade científica internacional.

O primeiro deles foi a identificação de cinco regiões cromossômicas em animais de experimentação (ratos), que explicavam em grande parte o aumento da pressão arterial nessas cobaias.

A partir desse resultado (publicado na revista científica *Genome Research*, já em 1995), muito sugestivo de que nessas regiões há genes diretamente envolvidos com a hipertensão, os pesquisadores iniciaram uma trabalhosa caçada a esses genes, valendo-se de múltiplas abordagens. Nesse momento, o cerco está se fechando e o grupo espera responder, dentro de alguns meses, às seguintes perguntas: qual ou quais dessas cinco regiões participam da gênese da hipertensão? Qual a importância relativa de cada uma delas na emergência da hipertensão? E em quais cromossomos humanos encontram-se as regiões identificadas nos ratos? – porque se as regiões são muito parecidas (homólogas) entre uma espécie e outra, elas não estão, no entanto, nos mesmos lugares, ou melhor, nos mesmos cromossomos. Nos ratos, duas delas se encontram no cromossomo 2 e as



outras três estão nos cromossomos 4, 8 e 16. Nos homens, ainda não se sabe e há que procurá-las nos 23 pares de cromossomos da espécie.

Encontrar os genes defeituosos é essencial para entender os vários sistemas de controle da pressão arterial, as razões das diferenças no comportamento desses sistemas mesmo em indivíduos igualmente hipertensos e, por fim, para estabelecer as práticas preventivas e terapêuticas mais adequadas para cada paciente. Afinal, cortar o sal da dieta, prática recomendada de forma genérica pelos médicos para todos os hipertensos, “ajuda somente 20% deles”, diz Krieger, presidente da Academia Brasileira de Ciência, entre outros cargos. Há pessoas,

completa ele, em que a hipertensão nada tem a ver com a alimentação. Os genes que apresentam defeitos de que resulta a hipertensão não são necessariamente os mesmos em dois diferentes pacientes, ainda que tenham o mesmo nível pressório.

“Não temos a ilusão de explicar a hipertensão por um único defeito genético”, diz o professor José Eduardo Krieger, diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Incor e filho do professor Eduardo Moacyr Krieger. Coordenador de toda a parte de genética da pesquisa, ele observa que em nenhum problema biológico complexo, ou mais precisamente, em nenhuma das doenças complexas que normalmente corres-

pondem a grandes linhas dos programas de saúde pública, caso de diabetes, câncer, asma, aterosclerose, epilepsia e esquizofrenia e outras, encontra-se um único gene responsável pelo mal. O que as explicam são defeitos em vários genes que, sob a influência de diferentes fatores ambientais, determinam as manifestações da doença”, diz.

Danos cumulativos: A hipertensão, que se caracteriza por uma elevação dos níveis de pressão arterial acima do limite de 140/90 milímetros de mercúrio, ou, como se diz comumente no Brasil, acima da medida de 14 por 9 (centímetros de mercúrio), “é uma matadora silenciosa”, define Krieger pai, especialista em



LURABENTRIX

fisiologia cardiovascular. Por longo tempo, o hipertenso não apresenta sintoma algum e, quando ele finalmente sente alguma coisa estranha, a doença já está em seu estágio mais avançado, já tem um longo tempo de ação e acumulou muitos danos para o organismo.

A par do que representa de ameaça para cada paciente em particular, porque altera a fisiologia normal do coração, do cérebro e dos rins, tornando-se uma causa poderosa de enfarte do miocárdio, de acidente vas-

para controle da pressão e, em consequência, verificou-se uma redução significativa na ocorrência de derrames, insuficiência renal e enfartes resultantes da hipertensão. De qualquer sorte, um grande número de pacientes desenvolve essas complicações e a hipertensão permanece, assim, como um dos maiores fatores de risco da maior causa de morte no mundo atual, ou seja, as doenças cardiovasculares.

Peneira genética: O estudo desenvolvido no Incor examina também como

das cobaias, e com a caracterização dos marcadores moleculares utilizados no processo de procura dos genes. Os marcadores são determinadas moléculas que “engancham” nas regiões cromossômicas alvo do estudo e por isso mesmo têm um papel informativo ou revelador daquilo que se procura. No caso, para os 21 pares de cromossomos das cobaias, os pesquisadores dispõem de um painel de 336 marcadores, cuja utilização tornou-se possível graças à colaboração do Incor com centros de pesquisa norte-americanos (Harvard e Medical College de Wisconsin), particularmente o laboratório do doutor Howard Jacob, que vem trabalhando intensamente no projeto genoma do rato.

O cruzamento entre animais hipertensos e normotensos (com pressão arterial normal) visou à obtenção de netos, isto é, de uma segunda geração de animais cuja carga genética apresentasse uma distribuição aleatória dos genes de cada um dos dois tipos. E nas experiências com essa geração, os pesquisadores buscaram determinar com precisão, por meio de marcadores moleculares, que regiões cromossômicas aqueles netos que se tornaram hipertensos haviam herdado de seus

avós hipertensos. Dessa forma, obteve-se o primeiro resultado significativo do projeto: a identificação das cinco regiões que podem guardar os segredos genéticos da hipertensão.

A partir daí, o grande trabalho nos últimos três anos passou a ser substituir cada uma das regiões identificadas por uma região similar normal, ou seja, “construir” gerações seguidas de animais (processo chamado linhagem de ratos congênicos) até chegar ao desenvolvimento de um rato idêntico a seu ancestral hipertenso, exceto por uma região cromossômica proveniente do ancestral normotenso.

Como se faz isso? Simplificando, quando se cruza um animal normo-



HIGUEL BOYVAN

Eduardo Moacyr Krieger: causas diferentes para pacientes com pressão idêntica

cular-cerebral (“derrame”) e de insuficiência renal, a hipertensão é um grave problema de saúde pública. Ela acomete, no Brasil, 20% da população adulta e nada menos que 50% dos idosos com mais de 60 anos, percentuais muito similares aos de grande parte dos países ocidentais.

Na medida em que sua base genética ainda permanece desconhecida, não se pode falar em cura da hipertensão, e sim em controle ou em regulação da doença. De fato, os médicos tentam controlá-la reduzindo os níveis da pressão arterial, por meio de alteração dos hábitos do paciente e da administração de medicamentos. Nos últimos 20 anos, registrou-se um desenvolvimento notável dos fármacos

os fatores ambientais (como estilo de vida, fumo, alimentação, sedentarismo e estresse) influenciam e determinam a hipertensão. Em outras palavras, busca-se estabelecer a natureza de sua interação com os determinantes genéticos no desencadeamento da doença e de suas complicações. Mas são mesmo os aspectos genéticos que constituem a parte mais fundamental e excitante da pesquisa. Nesse campo, o projeto desdobra-se por duas grandes vertentes.

Na primeira vertente – a que resultou na identificação das regiões cromossômicas relacionadas com o aumento da pressão arterial dos ratos –, os pesquisadores trabalham com cruzamentos e caracterização fenotípica

tenso com um hipertenso, obtém-se um descendente cuja carga genética é 50% resultante de um e 50% resultante do outro. Num processo de retrocruzamento, ou seja, tomando esse descendente e fazendo seu cruzamento com o rato hipertenso, o novo descendente terá 75% da carga genética do hipertenso e 25% do normotenso. Repetindo-se sucessivamente o mesmo processo, quer dizer sempre tomando representantes de uma nova geração e cruzando-os com o velho hipertenso, em determinada altura consegue-se um animal cuja carga genética é 99,9% resultante do hipertenso e um quase nada é proveniente do normotenso. Mas é justo nesse “restinho” transferido do normotenso que está uma chave preciosa para se investigar de forma mais profunda a relação entre determinada região cromossômica e as manifestações da hipertensão. Porque não se trata de um restinho qualquer, mas de uma determinada região cromossômica que os pesquisadores escolheram a priori e mantiveram presente ao longo de todo o processo de linhagem. Como? “Nesse processo, nascem uns 100 ratos por geração. Estabelecemos a tipologia genética de todos e escolhemos para os novos cruzamentos sempre os que trazem a região que nos interessa”, explica José Eduardo Krieger.

Nesse percurso trabalhoso, os pesquisadores já estão trabalhando com a décima geração das linhagens referentes a cada uma das cinco regiões de interesse e Krieger comemora agora o fato de, em relação a duas delas, se ter obtido as linhagens desejadas e que começarão a ser investigadas.

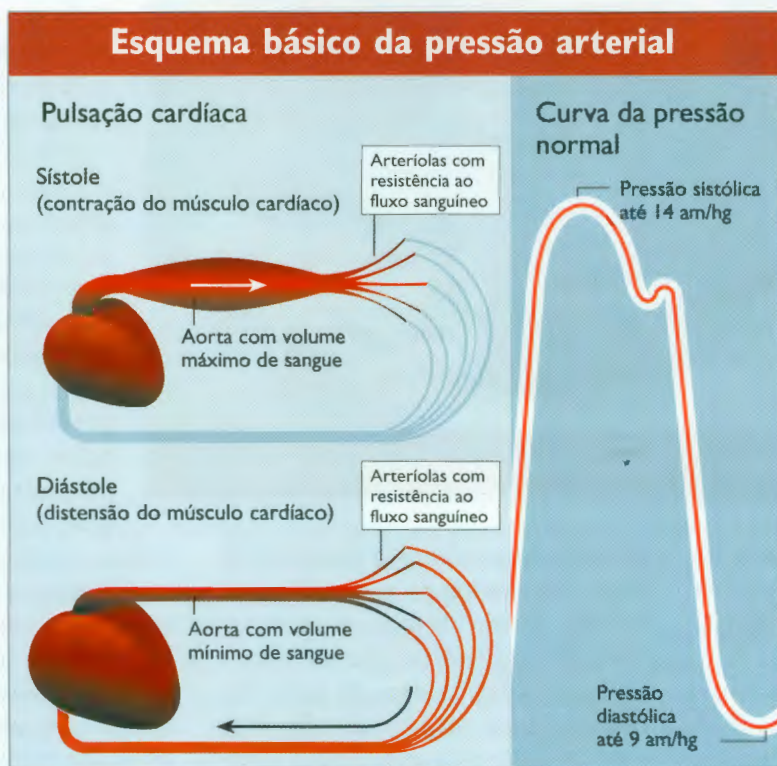
Com essa espécie de análise combinatória em marcha, a esperança dos pesquisadores é estabelecer, dentro de alguns meses, com rigor experimental, qual ou quais das cinco regiões cromossômicas estão de fato implicadas com a doença. E, demonstrado isso, começar a caçada dentro de alguns milhões de bases existentes na região dos genes que interessam. “Imaginamos que isso é trabalho

Uma bomba, um sistema de freios

De maneira muito simplificada, pode-se tentar explicar a pressão arterial assim: quando o coração, que é uma bomba sofisticada, ejet o sangue para os vasos (no movimento de sístole), e o acumula ali, a pressão arterial chega a seu ponto mais alto. No espaço entre este e o próximo batimento, tempo em que o ventrículo está se enchendo com o sangue que retorna das veias (diástole), a pressão arterial chega a seu ponto mais baixo. Curioso é que o tempo que a bom-

ba cardíaca leva no processo de enchimento é maior que o tempo gasto na ejeção do sangue (respectivamente, dois terços e um terço do tempo entre um batimento e outro), mas mesmo assim o fluxo sanguíneo na periferia do corpo é constante e equilibrado. Para conseguir isso, o organismo conta com a resistência das arteríolas e a elasticidade do sistema arterial, que amortecem as flutuações de descarga da bomba cardíaca.

São muitos os fatores que interferem no complexo equilíbrio desse sistema, vital para o organismo, e que aparentemente está bem quando o limite máximo da pressão sistólica é 14 centímetros de mercúrio e, o da diastólica, 9 centímetros de mercúrio.



para mais uns cinco anos”, diz José Eduardo Krieger.

Sistemas de controle: A segunda grande vertente dos estudos genéticos da hipertensão desenvolvidos pela equipe de Krieger vem utilizando um conjunto de ferramentas analíticas e sintéticas da biologia molecular para

conhecer melhor os sistemas de controle da pressão arterial. “Acreditamos que são alterações nas diferentes vias que controlam a pressão que levam o indivíduo a responder inadequadamente aos estímulos ambientais, com o desenvolvimento de patologias”, resume José Eduardo Krieger.

Um desses sistemas é o renina-angiotensina, que participa de maneira

importante da homeostasia cardiovascular, ou seja, o equilíbrio normal da função cardiovascular. A angiotensina é uma substância formada na circulação pela renina secretada pelo rim, e admite-se hoje que é também gerada localmente nos vasos arteriais. Um dos componentes desse sistema é a enzima conversora de angiotensina (ECA), e os pesquisadores do Incor vêm testando, por meio de três abordagens diferentes, a hipótese de que ela seja um gene de suscetibilidade cardiovascular.

(os genes têm sempre uma região codificadora e outra promotora ou reguladora), onde estão suas seqüências regulatórias, a um gene repórter ou gene marcador – o escolhido tem sido a luciferase (encontrada no vagalume, por exemplo), cuja emissão de luz possibilita uma quantificação da atividade que se quer observar. Em seguida, a molécula recombinada é injetada em célula em cultura ou no ventrículo do rato – dessa forma, quando analisam-se as células ou tecido, uma maior ou menor emissão

de da ECA que carregam – de zero a quatro cópias (configurando camundongos knock-out e knock-in). Verifica-se, por exemplo, qual o efeito de um determinado estímulo, como o exercício físico, no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (que está associada à hipertensão) em cada um dos grupos. A hipótese que está sendo testada é: um maior número de cópias do gene da ECA determina respostas mais graves – maior hipertrofia do músculo cardíaco, enfartes maiores, etc.

Esses estudos estão sendo viabilizados graças à colaboração com o laboratório do doutor Oliver Smithier, na Universidade da Carolina do Norte, que produziu e cedeu os camundongos para o grupo brasileiro.

A terceira abordagem, partindo do conhecimento de que na população humana encontram-se variantes genéticas funcionais que influenciam na atividade da ECA, tenta responder se naquelas pessoas em que esse gene é mais ativo as probabilidades de aparecimento de complicações cardiovasculares são mais elevadas. Essa parte do estudo vem sendo feita diretamente com pacientes do Incor, portadores de diferentes cardiopatias, dentro de um esforço para estratificar variantes genéticas e riscos da hipertensão e outras patologias cardiovasculares.

Os estudos fisiológicos feitos no Incor dentro do grande projeto sobre hipertensão têm confirmado, por testes sofisticados, algumas suspeitas que os especialistas da área já tinham há muito tempo. Um exemplo: a atividade física em ritmo intenso não altera os níveis de pressão e não traz, portanto, benefícios aos hipertensos. O exercício moderado, sim, lhes é benéfico, porque diminui a atividade simpática – do sistema nervoso autônomo, um dos controladores da pressão arterial – para o coração, com repercussões positivas sobre o nível da pressão. Em outras palavras, o exercício moderado melhora a elasticidade das grandes artérias. Re-



MIGUEL BOYVAN

José Eduardo: sem ilusões de explicar a hipertensão por um único defeito genético

A primeira abordagem cuida de verificar como o gene liga e desliga nas mais diversas situações fisiológicas e patológicas, isto é, como ele é ativado e como é desativado, diminuindo, nesse caso, a síntese da ECA e influenciando, por conseqüência, a produção da substância ativa do sistema, a angiotensina II (num esquema rápido: o substrato, ou a grande proteína na base de tudo isso é o angiotensinogênio que, por ação da renina, converte-se em angiotensina I e que, por ação da ECA, converte-se em angiotensina II).

Para observar o processo liga-desliga, os pesquisadores, primeiro, criam uma molécula recombinada, ligando a região promotora do gene da ECA

de luz é proporcional à atividade da região regulatória do gene sob investigação. Assim identificam-se as seqüências regulatórias que trabalham no sistema liga-desliga do gene. “Se essa seqüência for identificada, abrimos caminho para uma melhor compreensão do funcionamento do gene da ECA e uma oportunidade para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes”, comenta José Eduardo Kreiger, fugindo de uma conclusão taxativa porque as pesquisas nesse campo ainda não terminaram.

A segunda abordagem para decifrar o sistema renina-angiotensina vem trabalhando com um estudo comparativo entre animais idênticos, exceto pelo número de cópias do ge-

gistre-se como curiosidade que filhos de pacientes hipertensos apresentam desde muito cedo, antes de começarem a apresentar pressão alta, um aumento das atividades simpáticas.

Uma série de testes vem sendo feita no Incor para medição dessa atividade. Um deles é a microneurografia, que consiste na implantação de uma agulha no nervo peroneo para identificar as descargas do sistema simpático. Um outro teste é mergulhar a mão em água gelada por 10 segundos. Um terceiro consiste em estudos do endotélio, que libera substâncias vasodilatadoras. São exemplos, segundo José Eduardo Krieger, de como o estudo da fisiologia humana se tornou realidade, porque antes essas técnicas só podiam ser usadas com animais de laboratório.

Com o trabalho percorrendo diferentes abordagens, o que José Eduardo Krieger destaca, no entanto, é que em doenças complexas a informação de um só marcador nunca é suficien-



Incor chegou à décima geração de ratos congênicos

MIGUEL BOYVAN

te. “É por isso que estamos investigando simultaneamente nos indivíduos variantes da ECA e angiotensinogênio e, no futuro, esperamos fazer uma análise combinatória que leve em consideração os diferentes componentes do metabolismo de lípidos e cascata de coagulação sanguínea.” Segundo o jovem Krieger, isso permitirá uma estratificação da genética de cada indivíduo, uma percepção das variantes que podem levar a determinado fenótipo e, daí, a uma avaliação de risco com precisão. “Só assim teremos uma medicina cada vez mais preventiva e, quando ela precisar ser curativa, o será com grande precisão e eficácia.” •

PERFIS

• EDUARDO MOACYR KRIEGER, gaúcho, fisiologista, 71 anos, é um dos maiores especialistas brasileiros em hipertensão. Presidente da Academia Brasileira de Ciências, dirige a Unidade de Hipertensão do Incor e é professor aposentado, desde 1985, da Medicina da USP de Ribeirão Preto. Krieger é um dos três fundadores e editores da revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Publicou mais de 120 trabalhos científicos em revistas internacionais.

• JOSÉ EDUARDO KRIEGER, 39 anos, é médico formado pela USP de Ribeirão Preto, PhD em Fisiologia pelo Medical College of Wisconsin e pós-doutorado em Biologia Molecular nas universidades de Harvard e Stanford. É livre-docente do Departamento de Clínica Médica da FM-USP e diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Incor. Publicou 21 trabalhos científicos em revistas internacionais.

Projeto: *Bases Fisiológicas da Hipertensão: Estudo Integrado*

Investimento: US\$ 542,4 mil e R\$ 236,2 mil

As chances do Brasil na pesquisa mundial

A pesquisa sobre hipertensão já atravessa décadas, mas a determinação de todos os genes responsáveis por ela ainda parece distante. Nesse sentido, as duas descobertas mais importantes foram a descrição do angiotensinogênio como gene implicado com a hipertensão, em 1992, e a identificação, em 1991, de uma região no cromossomo 10 do rato, mais tarde encontrada no cromossomo 16 do homem, como *locus* onde se encontra um gene (talvez, genes) também ligado ao problema.

A descoberta de 1992 foi feita pela equipe do francês Pierre

Curvol, do Colège de France. A outra corresponde a resultados obtidos pelo grupo, também francês, de M. Lathrop, do Inserm, em conjunto com as equipes de Victor Dzau, da Universidade de Harvard, e de Erick Lander, do MIT.

No ambiente de pesquisa da hipertensão, com especialistas dos Estados Unidos, França, Inglaterra, Alemanha, Itália, Canadá, Austrália e Japão, o Brasil não faz feio. Desenvolve pesquisa qualitativa avançada – falta quantidade, problema que, os especialistas apostam, será minorado com os resultados do programa Genoma-

FAPESP. Afora o Incor, o grupo de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina investiga as bases genéticas da hipertensão. E muitos grupos paulistas e de outros Estados brasileiros fazem pesquisa experimental de aspectos variados da hipertensão. Aliás, vale não esquecer que o Brasil, em meados dos 60, deu uma contribuição fundamental à pesquisa de doenças cardiovasculares: o BPF, fator de potenciação de bradicinina, molécula descoberta por Sérgio Ferreira, que deu origem ao captopril, remédio usado no mundo para as mais diversas doenças cardiovasculares.