

Coração reconectado

Equipe do Instituto do Coração identifica possível marcador genético da durabilidade da ponte de safena

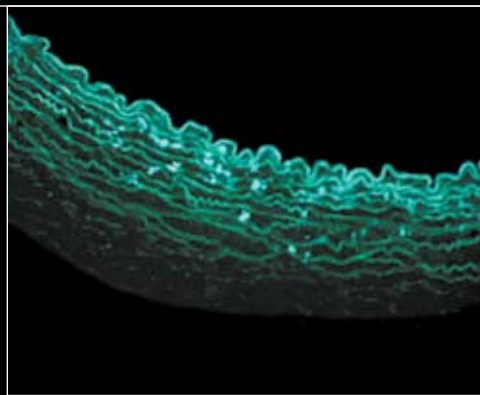
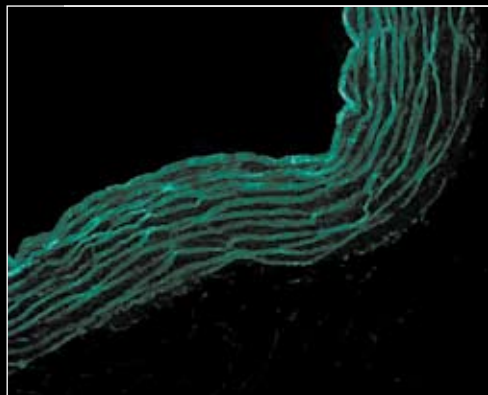
RICARDO ZORZETTO | ILUSTRAÇÕES MARCOS GARUTI

No laboratório do 10º andar do Instituto do Coração (InCor) da Universidade de São Paulo, de onde se tem uma vista privilegiada da capital paulista, a equipe do médico José Eduardo Krieger começa a desvendar as origens de um fenômeno que limita a cerca de uma década a durabilidade de parte das pontes de safena: o entupimento, ainda que parcial, do implante de segmentos dessa veia retirada da perna usado para restabelecer o suprimento de sangue do coração, reduzido pelo acúmulo de placas de gordura no interior das artérias que o irrigam. Em uma série de experimentos com ratos e vasos sanguíneos humanos, o grupo do InCor vem descobrindo como fatores físicos alteram a programação das células de veias submetidas às condições de funcionamento das artérias. Essa reprogramação pode causar o espessamento excessivo da veia e o bloqueio da ponte alguns anos depois da cirurgia de revascularização do coração.

Essa busca já resultou na identificação de várias proteínas envolvidas no espessamento dos implantes, duas delas caracterizadas completamente. “Acreditamos que, com esse tipo de investigação, chegaremos a uma ou mais proteínas que poderão ser usadas como indicadores da durabilidade da ponte de safena ou como alvos para ampliar a eficiência do enxerto”, afirma Krieger. Ele espera em alguns anos produzir um teste genético capaz de predizer se o candidato à cirurgia apresenta tendência a desenvolver oclusão da safena e desenvolver tratamentos para minimizar o problema. “Estamos trabalhando para descobrir quando e como intervir”, diz.



Direto no alvo



Criada em 1967 pelo médico argentino René Favaloro, a ponte de safena revolucionou a cirurgia cardíaca. Em uma longa operação na qual foi feito um corte de 30 centímetros no peito do paciente e as costelas foram afastadas, Favaloro conectou uma extremidade de um segmento da safena com quase um palmo de comprimento à artéria aorta e a outra extremidade à região do coração privada de sangue. Assim conseguiu fazer o sangue contornar o bloqueio e voltar a alimentar o músculo mais forte e resistente do corpo, que se contrai em média 100 mil vezes por dia enviando nutrientes e oxigênio para todos os tecidos do organismo. Nesses 42 anos esse procedimento foi aperfeiçoado e vem sendo repetido diariamente no mundo todo, prolongando a vida de milhões de pessoas – estima-se que a cada ano sejam feitas 47 mil cirurgias de revascularização cardíaca no Brasil e 450 mil nos Estados Unidos.

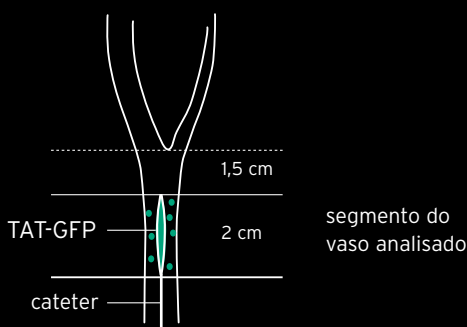
Essa solução, porém, não é perfeita e muitas vezes paga-se um preço alto por fazer uma veia, vaso especializado no transporte de volumes pequenos de sangue sob baixa pressão, funcionar como artéria, com fluxo cerca de dez vezes maior e pressão mais de 20 vezes mais elevada. A mudança nas condições em que atua causa o espessamento exagerado da camada de células mais interna do vaso. Como consequência, as placas de gordura que em geral levam de quatro a cinco décadas para comprometer a passagem de sangue nas artérias do coração (coronárias) se formam bem mais rapidamente e obstruem cerca de 10% das pontes de safena em apenas dez anos, exigindo a realização de uma nova cirurgia. Essa proporção de entupimentos, que já alcançou quase 50% até o início dos anos 1990 e diminuiu com as alterações na dieta e o uso de medicamentos para baixar o colesterol, ainda é considerada elevada.

“Embora na maioria dos pacientes seja possível usar artérias como as mamárias para revascularizar o músculo cardíaco, a veia safena é uma opção muito adotada, por-

que exige um procedimento menos invasivo e a safena é um vaso extenso, que permite obter vários enxertos”, explica Luís Alberto Dallan, cirurgião do InCor que colabora com a equipe de Krieger. “Se resolvermos o problema de oclusão da ponte de safena, solucionaremos a principal questão da cirurgia cardiovascular.”

Foi quase ao acaso que cinco anos atrás o grupo do InCor começou a investigar o espessamento das pontes de safena. Na época a biomédica Ayumi Miyakawa trabalhava com Krieger na identificação de genes acionados nas células da camada mais interna dos vasos sanguíneos – o endotélio – pela passagem do sangue. Assim como a água de um rio lambe suas margens como se quisesse arrastá-las com a corrente, o fluxo de sangue tenta levar consigo as células que recobrem internamente veias e artérias. Essa força física, conhecida como força de arrasto, ativa a maquinaria das células do endotélio e modifica a produção de uma proteína que controla o funcionamento do vaso e a pressão arterial, a enzima convertora de angiotensina. No Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Ayumi dispunha de um aparelho que simulava o arrasto, mas não estava satisfeita. Faltava representar uma segunda força a que estão submetidas as células dos vasos sanguíneos: a pressão que o sangue exerce contra a parede de veias e artérias, fazendo-os dilatar cada vez que o coração pulsa. Ayumi pediu à equipe de bioengenharia do InCor que a ajudasse a desenvolver um equipamento capaz de reproduzir as duas forças tanto de modo independente como simultâneo. Com o aparelho pronto, ela percebeu que poderia testar os enxertos de safena em condições semelhantes às que enfrentam quando implantados no coração.

Tão logo o cirurgião termina a sutura e libera a passagem do sangue, o pedaço de veia que passa a trazer sangue rico em oxigênio da artéria aorta para o músculo cardíaco sofre um impacto brutal. Formada por três camadas delgadas de células, a veia, que antes transportava sangue rico em gás carbônico e suportava pressões va-



Artéria carótida de rato tratado com proteína geneticamente alterada para penetrar mais facilmente nas células (*pontos brilhantes na imagem ao lado*) e de roedor que recebeu versão normal da mesma proteína (*à esquerda*)

riando de 5 a 20 milímetros de mercúrio (mmHg), passa a trabalhar sob uma pressão 25 vezes maior (cerca de 120 mmHg) se quem recebeu o implante não for hipertenso. Já se sabia que, sob as novas condições, a veia se torna mais espessa depois de algum tempo. Mas não se conheciam quais fatores físicos nem quais genes disparavam essa transformação, que, exacerbada, pode ser danosa e prejudicar o funcionamento da ponte.

Durante quatro dias Ayumi cultivou segmentos de 2 centímetros de safenas de pessoas operadas por Dallan sob dois regimes de fluxo e pressão – o de veia, em que 5 mililitros de um composto rico em nutrientes e oxigênio atravessavam o vaso a cada minuto com pressão média de 5 mmHg, e o de artéria, com fluxo de 50 mililitros por minuto e pressão de 80 mmHg. Já no primeiro dia ocorreram transformações. As células de veias submetidas às condições de artéria começaram a apresentar sinais de apoptose (morte programada), enquanto as das veias mantidas sob baixa pressão e baixo fluxo se mantiveram vivas.

Era um resultado interessante que despertava ainda mais a curiosidade. O que aconteceria com a ponte de safena depois de mais tempo? As mudanças observadas nessas condições artificiais seriam semelhantes às que ocorrem em seres vivos?

Ante essas dúvidas, Ayumi e Krieger decidiram desenvolver um experimento que refletisse melhor o que acontece com safenas implantadas no coração humano. Como obviamente é muito complicado obter amostras dessas veias depois que a ponte está conectada ao coração e a pessoa deixou a sala de cirurgia, os pesquisadores bolaram uma operação em ratos na qual uma das artérias carótidas, que levam sangue do coração para a cabeça, é conectada a uma veia jugular, que drena o cérebro. Em seguida, acompanharam por até três meses as alterações apresentadas pelas jugulares mantidas sob o regime de alto fluxo e pressão elevada característico das artérias.

> OS PROJETOS

1. *Identificação de genes com expressão diferenciada em veia safena submetida ao regime arterial*
2. *Genes diferentemente expressos em modelo de arterialização de enxerto venoso no rato*
3. *Estudo da hipertensão arterial: caracterização molecular e funcional do sistema cardiovascular*
4. *Identificação e caracterização de genes ligados à arterialização do enxerto venoso humano*

MODALIDADES

1. Bolsa pós-doutorado (Ayumi Miyakawa)
2. Bolsa de doutorado (Thaiz Ferraz Borin)
3. Projeto Temático
4. Auxílio à pesquisa

COORDENADORES

- 1, 2 e 4. JOSÉ EDUARDO KRIEGER - InCor
3. EDUARDO MOACYR KRIEGER - InCor

INVESTIMENTO

1. R\$ 195.776,52 (FAPESP)
2. R\$ 98.222,52 (FAPESP)
3. R\$ 6.111.202,31 (FAPESP)
4. R\$ 50.000,00 (CNPq)



Entre o primeiro e o terceiro dias houve um intenso aumento na taxa de morte de células da jugular dos roedores ligada à carótida. Depois da primeira semana, no entanto, a situação mudou: as células mortas passaram a ser substituídas por células musculares características das camadas mais externas dos vasos sanguíneos. Também começou a se formar o anel de fibras elásticas observado apenas em artérias, separando a primeira da segunda camada de células. “São sinais de que as veias estão tentando se adaptar às condições do novo ambiente”, explica Ayumi.

O problema é que em muitos casos essa adaptação foge ao controle e, em vez de deixar a veia mais robusta, termina por entupi-la. Ao microscópio, Ayumi e Thaiz Borin notaram que a camada mais interna da jugular, em geral formada por uma fileira de células, tornara-se cem vezes mais espessa, enquanto as duas camadas mais externas, compostas por células musculares contráteis, haviam apenas dobrado.

Nesse período de transformação celular o nível de atividade de alguns genes chamou a atenção de Krieger e Ayumi. Um deles é o que contém a receita da p21, uma das proteínas que inibe a reprodução celular. Uma semana depois que a carótida dos roedores havia sido conectada à jugular, o nível da p21 nas células da veia caiu para quase a metade do normal e continuou baixo até o final do experimento – sinal de que o gene havia sido desativado pela mudança de ambiente.

Ao mesmo tempo, o gene responsável pela produção da proteína CRP3, em geral ativo apenas nas artérias, foi acionado logo após a jugular dos roedores passar a funcionar sob pressão elevada transportando grandes volumes de sangue – esse gene também apareceu ativo em safenas humanas submetidas à condição de artérias. Já no primeiro dia a CRP3, proteína componente da estrutura que dá forma às células, o citoesqueleto, passou a ser produzida na jugular em níveis semelhantes aos em que é encontrada nas artérias. Sua produção diminuiu um pouco depois do primeiro mês, mas permaneceu elevada durante todo o experimento. Aparentemente foi o aumento de pressão, e não o da força de arrasto, que acionou a maquinaria celular e estimulou a produção dessa proteína, relata Luciene Gastalho Campos em artigo publicado em abril deste ano na *Cardiovascular Research*. “Acreditamos que a produção dessa proteína seja importante para a remodelagem inicial das veias que têm de suportar o regime hemodinâmico das artérias porque reforça a estrutura celular”, diz Ayumi.

O outro gene que apareceu ativo além do normal tanto na jugular de roedores conectada à carótida quanto nas veias usadas em pontes de safena é o da interleucina-1 beta, proteína do sistema de defesa do organismo produzida em inflamações. Logo após a cirurgia, as células da jugular dos ratos passaram a fabricar cerca de 20 vezes mais interleucina-1 beta do que essa veia mantida sob pressão e fluxos baixos de sangue. “Esse ambiente favorece o desenvolvimento de aterosclerose [acúmulo de placas de gordura nas paredes dos vasos], que pode ser agravado quando as taxas de glicose e colesterol no sangue estão elevadas”, diz Ayumi. Durante os três meses do estudo os níveis dessa proteína se mantiveram cinco vezes superior ao normal. Ayumi mediu ainda a taxa de interleucina-1 beta em pontes de safena de pessoas que haviam morrido de outras causas na primeira semana

depois da cirurgia de revascularização do coração ou entre um e cinco anos mais tarde. Verificou níveis mais elevados dessa proteína inflamatória, em especial na primeira semana após a operação.

Analisando o material genético desses indivíduos, ela e Krieger descobriram que os níveis mais elevados foram produzidos pelas pessoas que apresentavam uma alteração – a troca de uma única base nitrogenada, os tijolos da molécula de DNA – na posição -511 das duas cópias do gene da interleucina. Quem tinha um gene normal e um alterado fabricava níveis intermediários e pessoas com duas cópias saudáveis, níveis baixos de interleucina. “Por modularem o nível de interleucina em safenas humanas usadas na função de artérias, essas variantes talvez sirvam como um marcador genético da evolução da ponte de safena”, afirma Krieger.

A pesar desses resultados promissores, ainda serão necessários anos de trabalho até que se obtenha um teste genético capaz de indicar a durabilidade da ponte de safena. Enquanto avançam os experimentos para verificar a viabilidade do teste, a equipe do InCor pensa formas de controlar o funcionamento dos genes e prolongar os benefícios da cirurgia que usa a veia safena para substituir a função das coronárias doentes, problema que mata 7,2 milhões de pessoas por ano no mundo.

Eles já demonstraram que ao menos uma delas funciona. Usando bactérias, a equipe de Krieger conseguiu fabricar uma versão recombinante da p27, proteína da família da p21 também capaz de frear a reprodução celular. Em um experimento feito em parceria com as equipes de Ana Maria de Oliveira e Leandra Ramalho, da USP de Ribeirão Preto, o grupo do InCor implantou ao redor da carótida de ratos um anel de silicone que liberava lentamente a proteína alterada para penetrar mais facilmente nas células. Duas semanas após a cirurgia a multiplicação celular foi menor na artéria dos animais tratados com p27 recombinante do que na daqueles que receberam uma proteína inócua, de acordo com os dados apresentados em artigo na *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. “Essa é uma estratégia de intervenção que se mostrou capaz de controlar a reprodução celular apenas na região em que ela precisava ser bloqueada”, conta Krieger. A equipe do InCor planeja ainda usar proteínas associadas a *stents*, uma espécie de mola implantada no interior do vaso sanguíneo para mantê-lo aberto, ou balões como os usados em cateterismo para, se necessário, estimular ou inibir a reprodução celular e aumentar a durabilidade das pontes de safena. ■

➤ Artigos científicos

1. CAMPOS, L.C. *et al.* Induction of CRP3/MLP expression during vein arterialization is dependent on stretch rather than shear stress. **Cardiovascular Research**. abr. 2009.
2. NEUKAMM, B. *et al.* Local TAT-p27Kip1 fusion protein inhibits cell proliferation in rat carotid arteries. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**. v. 2, p. 129-136. jun. 2008.
3. BORIN, T. F. *et al.* Apoptosis, cell proliferation and modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21cip1 in vascular remodelling during vein arterialization in the rat. **International Journal of Experimental Pathology**. v. 90, p. 328-337. jun. 2009.

**PRESSÃO
ELEVADA
E PRODUÇÃO
DE ALTOS NÍVEIS
DE PROTEÍNAS
LIGADAS À
MULTIPLICAÇÃO
CELULAR
FAVORECEM
O BLOQUEIO
DE PONTE DE
SAFENA USADA
PARA RESTAURAR
O FLUXO DE
SANGUE PARA
O CORAÇÃO**