gene da apoE permite prever parte do risco de desenvolver doenças coronarianas. Essa proteína liga-se a um dos tipos de colesterol e permite que seja transportado do intestino, onde é absorvido, para os diferentes órgãos e tecidos do corpo – entre eles, o cérebro.

Usando a TreeScan, o grupo de Sing e Templeton constatou que uma das quatro variantes do gene da apoE – a apoE-4 – realmente favorecia o aumento no sangue dos níveis do colesterol LDL, que adere à parede dos vasos sangüíneos formando placas de gordura, e elevava o risco de problemas coronarianos. Em seguida ao anúncio da descoberta, a imprensa passou a rotular a apoE-4 como a *variante assassina* ou *alelo assassino* desse gene. Essa classificação, que seduz por indicar um culpado pelos problemas cardíacos, irritou profundamente os pesquisadores porque as pessoas estavam olhando apenas uma parte da questão – os genes – e haviam se esquecido da influência do ambiente.

A equipe das universidades Michigan, Cornell, Texas e Washington constatou que a afirmação da imprensa não fazia o menor sentido ao comparar como se associam duas a duas as variações mais freqüentes do gene (apoE-2, apoE-3 e apoE-4) com os níveis de colesterol dos idosos (baixo, normal ou elevado). Não havia um alelo assassino. "Os genes explicam apenas 7% do risco de desenvolver doença coronariana", afirmou Templeton. Os outros 93% dependem de fatores ambientais, como o nível de colesterol no sangue, determinado pela dieta e pelo estilo de vida sedentário. A combinação mais perigosa para o coração foi apresentada pelos portadores de uma cópia do alelo apoE-2 e outra do apoE-3, que tinham níveis de colesterol elevados. Essas pessoas corriam um risco até dez vezes maior de desenvolver problemas cardíacos do que as demais. Já os idosos com ao menos um alelo apoE-4, taxado de assassino, mas que mantinham níveis considerados normais de colesterol, foram menos suscetíveis a desenvolver problemas coronarianos do que aqueles que, nessa mesma condição, eram portadores dos alelos apoeE-2 ou apoE-3. Segundo Templeton, esses dados mostram que há interação entre os genes e os fatores ambientais. "Qual o gene assassino? Não sei. Depende do contexto."

"Infelizmente os médicos usam essas duas informações separadamente", comentou Templeton. Mas a natureza é mais complexa e não funciona assim, porque há interação entre os genes e o ambiente. Quando se analisa apenas a informação genética ou ambiental separadamente, o resultado pode ser enganoso. "Essa complexidade nos desafia", disse Templeton, "mas temos mais informações sobre o risco de doenças coronarianas quando avaliamos as duas informações juntas". Os genes são parte, e apenas parte, dessa história, reforçou o pesquisador, que em 1974 deu aulas durante três meses na Universidade de São Paulo. "Hoje a medicina tenta tratar a doença coronariana. Com esses dados estamos dizendo que é preciso tratar o indivíduo com doença coronariana. Os bons médicos já fazem isso", disse Templeton. A razão é que o que funciona para uma pessoa não necessariamente funciona para outra. O pesquisador lembrou ainda ser mais fácil alterar as condições ambientais do que modificar os genes. ■

José Eduardo Krieger

Bons resultados da reparação cardíaca com células-tronco não iludem pesquisador

NELDSON MARCOLIN

Pesquisas clínicas com células-tronco vêm sendo feitas em vários centros do mundo como uma esperança para resolver problemas cardíacos graves. Aprender como reconstruir músculo e vasos sangüíneos do coração utilizando essa terapia é um objetivo perseguido pelos pesquisadores porque infartos e isquemias estão entre as doenças que mais matam. Em São Paulo, José Eduardo Krieger, um especialista em novas abordagens terapêuticas para regeneração cardíaca, dirige o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor/FMUSP), um dos locais de excelência onde ocorrem algumas das pesquisas mais promissoras nesse setor. No dia 26 de junho, ele falou sobre o tema "Genômica, saúde e reparação cardíaca utilizando células-tronco" durante a agenda cultural da exposição *Revolução genômica*.

Nos últimos oito anos Krieger tem estudado o uso de células-tronco adultas na regeneração cardíaca, mas sempre de olho na pesquisa com as células-tronco embrionárias. "Trabalhar com a segunda é fundamental para entender todo o processo. Para as pesquisas de aplicação pré-clínica em animais de experimentação e no homem usamos as adultas, das quais temos mais conhecimento e experiência", disse. Para explicar a importância que a terapia celular poderá vir a ter, o pesquisador começou sua exposição lembrando que o Brasil gasta cerca de 5% do Produto Interno Bruto (PIB) em saúde. Os Estados Unidos despendem 15% e outros países desenvolvidos entre 6% e 12%. Apesar do gasto diferenciado, a insatisfação com os diversos sistemas de saúde é mais ou menos comum em todos eles. Para Krieger, uma das razões para isso é que dois terços do dinheiro são usados em

Especial genomica_parte1.indd 22 26.08.08 18:24:17

doenças crônico-degenerativas com resultados insatisfatórios.

"Estou falando das doenças prevalentes, como hipertensão arterial, câncer, doença coronária, diabetes, obesidade e outras que têm características multifatoriais", disse. Ou seja, não é um único defeito genético que pode determinar esses males, mas vários deles, simultaneamente. Além, claro, dos fatores ambientais. Outra característica delas é o aparecimento tardio justamente na fase em que o custo para tratar é mais alto, quando o paciente precisa ser internado. Uma das formas de melhorar significativamente essa situação e, conseqüentemente, o modelo de saúde é tentar entender como as variações genéticas determinam não só as diferenças entre os indivíduos, mas também como essa variação vai fazer com que alguém seja mais ou menos suscetível a desenvolver as doenças.

"Se pudéssemos saber em uma fase muito precoce da vida quais os problemas de saúde mais prováveis que uma pessoa terá, poderíamos colocá-la próxima do sistema e, assim, torná-lo mais racional", disse. A prática dessa medicina individualizada ou preditiva é a grande meta a ser alcançada para melhorar de modo efetivo a vida das pessoas e o modelo atual de saúde. Krieger alertou que esse é só um dos conceitos do setor que deve mudar. Além da medicina preditiva, ele aposta na medicina regenerativa. Para ilustrar o conceito, o pesquisador usou o coração, sua especialidade, como exemplo. "Quando alguém tem um infarto, várias células de músculo do coração são destruídas e, ao contrário da musculatura esquelética, elas não se regeneram", explicou. Se perder muitas células, ele deixa de funcionar. Hoje a isquemia cardíaca é tratada com medicamentos, cirurgia de revascularização (ponte de safena) e com a introdução de um cateter dentro do organismo para desobstruir o vaso sangüíneo. Mais recentemente esse cateter leva com ele um tipo de malha chamada *stent*, com medicamento, para manter o vaso aberto.

Ainda assim, um grande número de pessoas não se beneficia desses tratamentos e é preciso novas pesquisas médicas. É aí que aparece a reparação cardíaca biológica, objeto de estudo da equipe liderada por Krieger no InCor. "Em vez de apenas desobstruirmos os vasos sangüíneos, agora sabemos que o melhor a fazer é reconstruir vasos e músculo", disse ele. A formação de novos vasos e a substituição de células musculares ainda estão numa fase muito precoce, mas já existem estratégias de ação. Uma delas é usar as células-tronco, que Krieger chama metaforicamente de curinga, aquele mesmo dos jogos de baralho. "Já se fala há mais de 40 anos de engenharia de tecidos, mas o desenvolvimento de novos materiais junto com a possibilidade de os combinarmos com células-tronco está revolucionando essa área."

Krieger: anos de pesquisa com células-tronco adultas e embrionárias

Curingas

No jogo de baralho, quando o jogador não tem a carta que precisa ele pode usar um curinga genérico, que entra em qualquer lugar da canastra. Ou pode ser um curinga específico, que só entra em um determinado local. Os curingas biológicos de Krieger são as células-tronco embrionárias, que serviriam em qualquer parte da canastra, e as células-tronco adultas que só entram em alguns lugares. "Se a embrionária um dia precedeu todas as nossas células é porque ela tem a receita para fazer isso, mas para ser útil devemos saber fazê-la se diferenciar no tecido que queremos." Ele usa outro exemplo para mostrar como funciona esse tipo de célula: ela é como um computador que tem um *hardware* completo. Ocorre que ele só funciona se tiver um programa que o faça trabalhar como queremos.

Como se sabe que as embrionárias são um bom *hardware* se ainda não existe um programa conhecido que a faça funcionar? "É fácil demonstrar: seleciono uma célula-tronco embrionária do camundongo, que pode ser armazenada em temperaturas muito baixas, descongelada e cultivada novamente no laboratório e, finalmente, injetada em outro camundongo. O que ocorre é a formação de um tumor chamado teratoma", explicou. O teratoma tem células de todo tipo, como pele, pêlo e pedaço de dente. "Essa é uma evidência direta de que uma célula-tronco embrionária, mantida em laboratório, que foi congelada e descongelada, dá origem a componentes de todas as células." No entanto, esse conhecimento ainda é insuficiente para servir como terapia celular porque os pesquisadores estão longe de controlar todo o processo. Hoje eles sabem apenas que é possível fazer, mas não sabem como.

No laboratório do InCor já se conseguiu fazer cultura de células embrionárias se diferenciar em célula cardíaca. O problema é que elas estão juntas com outros tipos

de célula. Para dar certo, a diferenciação tem de ser realizada de forma controlada, caso contrário é inútil como terapia. Quando os pesquisadores conseguirem entender exatamente como essas células são programadas talvez nem seja preciso usá-las – o conhecimento adquirido com o estudo das células embrionárias poderá ser aplicado em outros tipos de célula. "Daí a importância da decisão do Supremo Tribunal Federal de reafirmar a lei que permite pesquisa com células-tronco embrionárias", enfatizou.

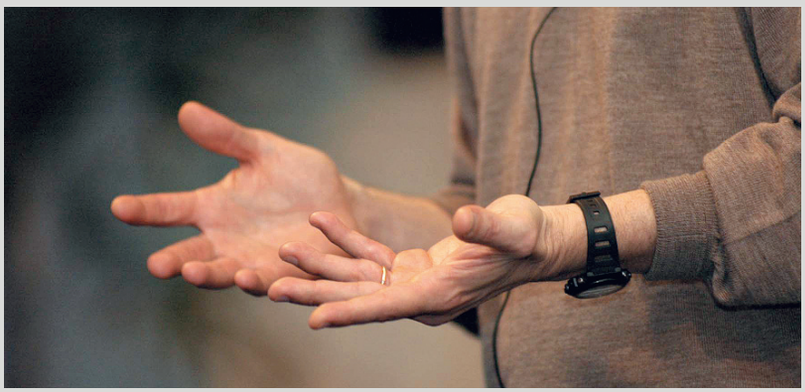
A equipe do InCor trabalha também com outro curinga, a célula-tronco adulta, encontrada em várias partes do organismo. A diferença é que, ao contrário da embrionária, ela só se encaixa em determinados tecidos. "Isso não é ruim se soubermos exatamente qual o problema que temos", disse. Um desses curingas específicos são as células da medula óssea, já bem conhecidas. Há décadas os hematologistas conseguem regenerar a medula de um indivíduo que tem câncer fazendo transplante de medula. Nos últimos anos surgiram evidências de que esse conjunto de células que estão dentro dos ossos longos, como o fêmur ou a bacia, além de fazer células da corrente sangüínea também pode se diferenciar em células de músculo ou da parede de vasos. "A grande vantagem desse curinga é que por ter sido muito testado pode ganhar um uso prático mais rapidamente. Sabemos que mal ele não faz." É por isso que a medula óssea é utilizada para pesquisa em seres humanos no mundo inteiro, incluindo InCor e outras instituições brasileiras.

Pode-se também obter células indiferenciadas da musculatura esquelética e da gordura. Estas últimas já são objeto de estudo na equipe de Krieger. As células de gordura são colocadas em meio de cultura. Aí começam os problemas: como fazê-las virar músculo cardíaco e vaso sangüíneo de forma controlada? O pesquisador explicou que, quando o sangue viaja dentro dos vasos, existe uma força física que é exercida pela corrente sangüínea. Essa força de arrastamento (ou *shear stress*, como é chamada em inglês) funciona para mudar o calibre dos vasos e alterar sua estrutura a médio e longo prazo. "É como se mudássemos a espessura da mangueira de jardim de acordo com a água que corre por ela."

"Usando um aparelho específico conseguimos mimetizar de maneira controlada a *shear stress* em laboratório e reproduzir na célula o que acontece em diversos pontos da nossa circulação", disse. O que se quer fazer é estimular a célula-tronco de gordura a virar célula cardíaca colocando-a sob condições que imitam a circulação do sangue no coração e nos vasos. "Se conseguirmos, já teremos andado meio caminho para utilizar essa célula como um agente terapêutico." Ao fazer essa experiência viu-se que essa célula parecia não ter mudado. Há uma série de marcadores moleculares utilizados e os pesquisadores não notaram diferença depois dos testes. "Mas continuamos olhando cuidadosamente e notamos que essa célula passou a produzir duas substâncias. Uma delas é o gás óxido nítrico (NO), típico de uma célula endotelial, um dos componentes da parede do vaso", contou. Como a célula de gordura normalmente não produz NO, ela pode não ter se transformado totalmente em endotelial, mas de alguma maneira se comportava como tal. A segunda descoberta é que ela produziu a substância VEGF (fator angiogênico), que estimula a formação de novos vasos. Ou seja, sob o mesmo estímulo dentro da máquina que simula a circulação, a célula indiferenciada passou a produzir VEGF.

O próximo passo, em curso, é testar essa célula treinada em laboratório para saber se ela consegue fazer um reparo cardíaco eficiente. Para isso, os pesquisadores usam ratos, nos quais é provocado infarto. Eles são separados em três grupos. Nos primeiros ratos infartados nada é injetado; no segundo é injetada a célula sem ser submetida ao *shear stress*; e no terceiro é introduzida a célula submetida ao *shear stress*. O objetivo é ver se o último grupo reagirá melhor que os outros. "Estamos em uma fase que o conhecimento não permite fazer avaliações definitivas e dizer se um procedimento é melhor do que o outro."

Os avanços conseguidos suscitam novas dúvidas. Quando houver uma célula-tronco que funcione a contento, quantas serão necessárias para reparar músculo e vasos do coração? A injeção será dada diretamente no músculo cardíaco, via circulação periférica, ou será preciso que um cateter leve as células até dentro do ventrículo do coração? Se o indivíduo tiver um infarto, a terapia terá de ser aplicada imediatamente ou será melhor depois de alguns dias ou semanas? "Todas essas dúvidas que se referem à reparação do sistema cardiovascular valem também para o tratamento de outras doenças crônico-degenerativas."



Especial genomica_parte1.indd 24 26.08.08 18:24:18

Krieger conta uma pequena história que ajuda a explicar sua cautela quanto aos resultados. "Em 2001 saiu publicado um artigo na revista *Nature* que mostrou pela primeira vez que injetando células-tronco da medula óssea em um ratinho após um infarto o animal melhora", disse. "Mas, além disso, a célula teria virado músculo e vaso." O trabalho se tornou um dos mais conhecidos naquela época, mas três anos depois surgiram outros dois *papers* também na *Nature* sobre a mesma experiência. Os autores não contestavam o fato de o rato ter melhorado, mas a explicação dos pesquisadores para isso. Ou seja, o mecanismo de ação é que não havia sido realmente esclarecido.

Dúvidas e cuidados

Mesmo com todas as dúvidas e cuidados, Krieger vê razões para ser otimista. Ele deu exemplos do que sua equipe está fazendo com animais de experimentação. "Tiramos uma célula de um ratinho, uma célula de fibroblasto da pele ou do músculo, por exemplo, e a modificamos geneticamente no laboratório para que ela produza substâncias que estimulem a formação de vasos sangüíneos ou músculo. Em seguida provocamos um infarto e depois de 24 horas o animal recebe o tratamento e vive por mais quatro semanas. Ao final desse período nós analisamos se o tratamento influenciou a estrutura e função do coração", disse. O resultado mostrou que os animais que receberam as células modificadas para produzir o fator angiogênico conseguiram estimular a formação de capilares (vasos mais simples). Além disso, a quantidade de fibrose no músculo reduziu-se, algo altamente positivo.

"Esses resultados foram de certa maneira tão espetaculares que, em vez de tentar entender melhor o que havia sido feito, iniciamos a mesma experiência com um animal intermediário, o porco, que é bem mais parecido com o homem do que o rato." Se ocorrer o mesmo sucesso, aí sim haverá empenho dobrado para entender o processo e partir para o homem.

Para fazer qualquer experiência parecida no ser humano é preciso ter, pelo menos, uma probabilidade muito grande que não haverá nenhum mal em usar a terapia. É preciso que haja uma janela de oportunidade ética para poder injetar as células-tronco. Mas não qualquer uma – nesse momento os pesquisadores estão limitados a célula-tronco de medula, pois é a única onde a experiência acumulada mostra que os riscos são mínimos. Restava saber quando e em quem se poderia usar. "No InCor identificamos uma oportunidade para agir. Por exemplo, uma pessoa que teve infarto não se recuperou inteiramente e deverá ser submetida à cirurgia para colocar pontes de safena. Às vezes ocorre de, por razões técnicas, não ser possível colocar todas as pontes e uma região que se beneficiaria da revascularização não será tratada. Essa é uma excelente janela de oportunidade ética", disse. Nesse lugar do coração onde não dá para colocar a ponte os pesquisadores poderão injetar as células. O procedimento tem de ser aprovado por comitês, internos e externos.

> "Quando entendermos exatamente como a célula-tronco embrionária é programada, talvez nem seja preciso usá-la"

Em uma primeira experiência com o paciente nas condições requeridas, quando ele chega ao centro cirúrgico e é anestesiado, os médicos retiram 100 mililitros do conteúdo da medula, que seguem para o laboratório alguns andares

acima. O objetivo é deixar a população de células da medula um pouco mais homogênea um procedimento feito em duas horas, durante o período em que a pessoa estava sendo operada para a colocação das pontes. "Assim que termina a cirurgia para a revascularização, o cirurgião injeta cerca de 140 milhões de células na região indicada." Durante o acompanhamento pós-cirúrgico foram feitos diversos exames como, por exemplo, de ressonância magnética para checar a situação do coração.

"Nesse caso, constatamos que os pacientes melhoraram e o efeito persistiu por 12 meses depois da cirurgia. Mas é preciso não se iludir porque nesse estudo os pacientes também receberam as pontes e a melhora era esperada. Não dá para saber se as células injetadas realmente tiveram influência ou se foi efeito das pontes." Krieger ressaltou dois pontos importantes como saldo do trabalho feito até agora. Primeiro, que o procedimento de injetar células-tronco durante a cirurgia é seguro. Segundo, examinando cuidadosamente a região do coração que recebeu somente as células, observou-se um aumento da perfusão de sangue na região.

Ainda que isso não seja uma "prova" de que a terapia funciona, é um dado encorajador. "Agora serão necessários estudos com maior número de pacientes, realizados por diferentes instituições, e de um modo que chamamos de aleatorizado e duplo-cego; ou seja, pacientes com as mesmas características serão tratados com as pontes e no local onde a ponte não pode ser colocada será injetada a célula ou não", disse. Nem o médico que fará as avaliações nem o paciente saberão naquele momento o que foi feito. Somente ao final de 12 meses de acompanhamento é que o código será quebrado e se saberá se o tratamento com as células foi benéfico. Este estudo, patrocinado pelo Ministério da Saúde, com a participação de vários hospitais e coordenado pelo InCor, está em curso. "Será preciso muita pesquisa e paciência para ter certeza de que estamos no caminho certo." No momento, Krieger se diz muito otimista. Mas cauteloso. ■

Michael Lynch

Geneticista norte-americano mostra a importância do acaso no processo evolutivo

Maria Guimarães

Quando se fala em evolução, aquela que Charles Darwin trouxe a público por volta de 150 anos atrás, o mecanismo que salta à mente é a seleção natural: a sobrevivência dos mais fortes diante de recursos limitados. Não é à toa. O nome completo do livro que fundou a disciplina em 1859 é *Sobre a origem das espécies por meio da seleção natural ou a preservação de raças favorecidas na luta pela vida*. Entrou para a história como *A origem das espécies*. Mas o principal da evolução não está aí, disse Michael Lynch, da Universidade de Indiana, Estados Unidos, na palestra "Genômica e evolução" – a última da programação cultural da exposição *Revolução genômica*. Adiada por dificuldades na obtenção do visto para a entrada de Lynch no Brasil, a apresentação ocorreu em 4 de agosto, com a exposição do Ibirapuera já encerrada, no Centro de Estudos do Genoma Humano, na Universidade de São Paulo.

A palestra foi também mais técnica do que boa parte das apresentações da agenda cultural que se desenrolou ao longo dos últimos meses, um prato cheio para os biólogos que lotaram o auditório. Em seus estudos, Michael Lynch integra evolução, ecologia, genômica, biologia celular e parasitologia para entender os mecanismos da evolução e como surgiu a complexidade dos genomas que os projetos de seqüenciamento hoje revelam.

Para o evolucionista norte-americano a seleção natural é uma das quatro forças da evolução, e não necessariamente a mais importante delas. Outra é a mutação, que acontece ao acaso e é a fonte da variação genética sobre a qual a seleção natural age. A recombinação, que a cada geração

Especial genomica_parte1.indd 26 26.08.08 18:24:19