

Giovana Aparecida Gonçalves

“Fibroblastos geneticamente modificados para estimular angiogênese e
vasculogênese em miocárdio isquêmico”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2007

Giovana Aparecida Gonçalves

Fibroblastos geneticamente modificados para estimular angiogênese e
vasculogênese em miocárdio isquêmico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Giovana Aparecida

Fibroblastos geneticamente modificados para estimular angiogênese e vasculogênese em miocárdio isquêmico / Giovana Aparecida Gonçalves. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Fibroblastos 2.Células cultivadas/transplante 3.Terapia de genes
4.Agentes indutores da angiogênese/uso terapêutico 5.Ratos 6.Isquemia miocárdica
7.Reperusão miocárdica

USP/FM/SBD-328/07



*“...não era ciência muito difícil, somente uma maravilhosa resposta’
que se mostrou 'tão correta
quanto a (teoria da) evolução...”*
Watson e Crick

Havia um grupo de ratos na cidade de Braga, os ratos como é suposto, andavam sempre a serem perseguidos por gatos, até que um certo dia, os ratos reuniram-se, para acabar com a perseguição dos gatos que os devoravam.

Decidiram pôr um chocalho no pescoço dos gatos, para que ao som deste se pusessem em fuga. Mas um rato mais vivido perguntou qual deles se atreveria a pôr o chocalho.

Ficou sem resposta.

Até que se ouviu um rato lá no fundo dizendo:

-- Eu o rato com crista, mais conhecido por "Rattcom"

levarei os chocalhos e coloca-los-ei aos pescoços dos gatos.

Este rato também era conhecido por ser o rato mais rápido das redondezas.

E assim foi, o valente rato conseguiu pôr os chocalhos em todos os gatos de Braga e redondezas.

Sendo assim, ficaram felizes para sempre.

(sem gatos na parada)

Este era o lema deles.



Aos ratos, que na doação da vida

Tornaram-me possível o título de "Doutor em Ciências".

*Ao meu marido onde
encontrei uma parte de minha alma,
uma razão para sorrir
e me proporcionou
os momentos mais felizes e livres
de minha vida.*

*A minha mãe Marlene,
que me ensinou a importância do trabalho
e com carinho
era meus ouvidos ao telefone
em todos os momentos de dificuldade,
sempre me aconselhando...*

*Ao meu pai Antonio,
que me ensinou a ser paciente e resignada
diante das adversidades da vida*

*Ao meu irmão Ronaldo,
meu exemplo de perseverança e
solidariedade.*

*Ao meu orientador Dr. José Eduardo Krieger,
que me ensinou a enfrentar desafios
com coragem e otimismo e despertou em mim
o entusiasmo pela Ciência, dizendo sempre :
“É preciso aproveitar as Janelas de Oportunidade
que se abrem e lembrar que
The sky is the limit!!!”*

Há algumas oportunidades na vida científica para aprendermos que a execução de idéias depende do trabalho em equipe:

À Dra. Claudia Becker, por me amparar nos meus primeiros passos no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – Incor, e me ensinar que, além do estudo árduo, contatos e cordialidade são elementos importantes;

À Leandro Cardoso, que com seu profissionalismo e suas mãos mágicas foi possível a realização do nosso trabalho de eficiência terapêutica – ele sempre dizia: “...pode deixar que vou caprichar nos infartos...” - e caprichava mesmo!!

À Dra. Jeane Mike Tsutsui e à sua doutoranda Dra. Sandra Falcão, Serviço de Ecocardiografia do Incor, pelos exames às cinco horas da manhã!!!!!!

Ao Prof. Paulo José Ferreira Tucci (Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíaca - UNIFESP), que abriu as portas de seu laboratório e me deixou usufruir de seu ambiente com muito carinho e muita atenção, sempre!

Aos seus alunos: Ednei e Ana Flávia pelos experimentos sempre de última hora.....

À Ângela e à Maria Cristina, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, pela realização das reações de imunohistoquímica.

Ao Márcio Chaves, de nosso laboratório, pela ajuda nas reações de imunofluorescência e também pelas piadas!!!!

À Dra. Ana Garippo (Laboratório do Prof. Francisco Laurindo- Incor), pela capturação das imagens de fluorescência.

E finalmente ao colega Dr. Gustavo Justo, pela ajuda fundamental na leitura e explicação sempre didática da função cardíaca, e pela paciência nos últimos dias de preparação desta tese.....

Há oportunidades em que além do trabalho em equipe, existem alguns e privilegiados casos, onde acontece a amizade:

À Dra. Paula Frizera Vassallo, pela colaboração nas construções virais, pelas exaustivas discussões aqui em casa até tarde, e também ao telefone, pela companhia de sempre.....

À Dra. Deborah Schechterman, pelas leituras e colaboração de meu primeiro manuscrito, pelas orientações, pelas ligações sempre carinhosas e preocupadas.....

Ao Dr. Leonardo Santos (UNIFESP), por todas as análises hemodinâmicas, e...pelo bom humor de sempre!

Também há outras oportunidades para aprendermos o significado do coleguismo.

Todos vocês fizeram parte, de uma forma muito especial, deste meu aprendizado.

**Aos meus colegas do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular pelo
constante apoio e amizade.**

E finalmente à Gal, minha gatinha de estimação, pela companhia de sempre e durante todo o tempo diante do computador..... ao meu lado!!!!

À **FAPESP** pelo apoio financeiro

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

1. Introdução	1
1.1. INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)	2
1.1.1. Epidemiologia	2
1.1.2. Fisiopatologia do infarto agudo do miocárdio (IAM)	4
1.2. ANGIOGÊNESE E FATORES ANGIOGÊNICOS	10
1.2.1. Angiogênese terapêutica	11
1.2.2. Vasculogênese e Angiogênese	12
1.2.3. Fatores angiogênicos e de crescimento	15
1.2.4. VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) e IGF-1 (<i>Insulin-like Growth Factor</i>)	16
1.3. ANGIOGÊNESE TERAPÊUTICA COMO TRATAMENTO DA DOENÇA ARTERIAL OCLUSIVA	19
1.4. A TERAPIA GÊNICA E A DOENÇA ARTERIAL OCLUSIVA	21
1.5. A TERAPIA GÊNICA ASSOCIADA À TERAPIA CELULAR	24
2. Objetivos	26
3. Material e Métodos	28
3.2. Animais	36

3.3. Cultura primária de fibroblastos cardíacos e de músculos esqueléticos de ratos adultos	36
3.4. Cultura primária de mioblastos de músculos esqueléticos de ratos adultos	38
3.5. Infecção Celular	38
3.6. Fluorescência	39
3.7. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)	39
3.8. Ensaio de imunofluorescência para detecção das proteínas hVEGF e hIGF-1 em fibroblastos cardíacos modificados com os respectivos vetores virais	40
3.9. Ensaio Colorimétrico	42
3.10. Implante celular	42
3.11. Dosagem da atividade da enzima β -galactosidase	44
3.12. Lesão miocárdica por isquemia seguida de reperfusão – <i>Experimento 1 (“Proof of Principle”) – Teste de fisibilidade.</i>	46
3.13. Lesão miocárdica por Ligadura permanente - <i>Experimento 2 – Teste de eficácia terapêutica.</i>	47
3.14. Estudo morfológico por ecocardiograma	47
3.15. Estudo hemodinâmico da função cardíaca	49
3.16. Avaliação Morfométrica	50
3.17. Ensaio imunohistoquímico para detecção das proteínas hVEGF e hIGF-1 em tecidos de corações de rato	51

3.18. Determinação de densidade capilar	53
3.19. Ensaio de imunofluorescência para detecção de vasculogênese em tecidos de corações de rato	53
3.20. Determinação da área de infarto e da área de colágeno	54
3.21. Extração de RNA	55
3.22. Transcrição Reversa (RT)	56
3.23. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	57
3.24. Polímero de fibrina autólogo - Autologous fibrin polymer (fibrin sealant) – utilizado no <i>Experimento 2</i> – <i>Teste de eficácia terapêutica.</i>	59
3.25. Procedência de sais, reagentes e equipamentos	61
3.26. Análise Estatística	64
4. Resultados	65
5. Discussão	100
6. Conclusões	115
7. Referências Bibliográficas	117
Anexo	

Abreviaturas

Ang1-angiopoietina 1

AdRRSVVEGF - adenovírus deficiente em replicação contendo o gene VEGF

AdCMVIGF-1EGFP – adenovírus deficiente em replicação contendo o gene IGF-1

AdRSVLacZ – adenovírus deficiente em replicação contendo o gene LacZ

BSA soro de albumina bovina

cDNA – DNA complementar

CPE-efeito citopático

CPK – creatinofosfoquinase

DMEN-Meio Eagle modificado por Dulbelcco

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNTP – desoxirribonucleotídeos

EDTA – ácido etilenodiamino teracético

EGFP proteína fluorescente verde

FGF - fator de crescimento de fibroblastos

GTU unidade de transferência gênica

HE – hematoxilina-eosina

Kb - kilopares de bases

LacZ – gene da enzima bacteriana β galactosidase

mRNA – RNA mensageiro

Pb – pares de base

PBS –Salina tamponada com fosfato

PCR – reação de polimerização em cadeia

PDF – pressão diastólica final

PMNs – leucócitos polimorfonucleares

SV 40 – vírus de símio tipo Tris – Tris(hidroximetil) aminometano 40

UV – ultravioleta

VEGF – fator de crescimento de endotélio vascular

IGF-1 – fator de crescimento ligado à insulina

Gonçalves, GA. Fibroblastos geneticamente modificados para estimular angiogênese e vasculogênese em miocárdio isquêmico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – Incor-HC/FMUSP; 2007.

Este trabalho avaliou o efeito de fibroblastos cardíacos (FC) modificados geneticamente para produzir VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e/ou em conjunto com IGF-1 (*insulin –like growth factor*) associados a um biopolímero de fibrina na indução de angiogênese, vasculogênese e melhora de função em miocárdio isquêmico. Em experimentos preliminares demonstramos que 10^6 FC modificados pelo AdRSVLacZ expressam o transgene na parede livre do ventrículo esquerdo de ratos Lewis por até 45 dias. Primeiro, o tratamento dos diversos grupos foi feito e 7 dias após, os animais foram submetidos à isquemia por 45 minutos seguida de reperfusão. 21 dias depois, a proteína humana VEGF e a densidade capilar apresentaram aumento no grupo VEGF (proteína humana VEGF: $1209,6 \pm 11,4$ vs. Veículo $123,1 \pm 5,2$; Célula $104,2 \pm 7,4$ e Null $73,2 \pm 2,4$ células positivas/campo, $p < 0,01$ e densidade capilar: $543,8 \pm 52,1$ vs. $349,2 \pm 0,9$, $288 \pm 19,0$ e $245 \pm 2,6$ capilares/ mm^2 , $p < 0,01$). A imunofluorescência dupla-marcação para detecção de células endoteliais e células musculares lisas apresentou aumento no grupo VEGF sugerindo formação de vasos estruturados (45 ± 3 vs. 10 ± 2 , 8 ± 1 e 16 ± 3 , $p < 0,001$) e a área de infarto foi reduzida no VEGF vs. VEÍCULO ($3,0 \pm 1,3\%$ vs. $8,0 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$). Para testar o efeito terapêutico desta intervenção, um segundo estudo foi realizado com os grupos: VEÍCULO= controle, POLÍMERO = biopolímero de fibrina, CÉLULA, NULL, IGF-1, VEGF e IGF-1+VEGF. Os tratamentos foram realizados 24 horas após os animais terem sido submetidos à isquemia por ligadura permanente. Um mês depois, as proteínas humanas VEGF e IGF-

1 apresentaram aumento significativo nos grupos VEGF, IGF-1 e IGF-1+VEGF, com $*p=0,0001$. Da mesma maneira, somente os grupos que receberam VEGF isoladamente ou associados a IGF-1 tiveram aumento do número de capilares e da densidade vascular e redução da porcentagem de colágeno ($35,12 \pm 7,05$ vs. $31,28 \pm 5,03$ vs. $30,07 \pm 6,21$ vs. $25,89 \pm 2,92$ vs. $15,43 \pm 2,02^*$ vs. $16,07 \pm 1,83\%^*$, $*p<0,05$, para os grupos Veículo, Polímero, Célula, Null, IGF-1, VEGF, IGF-1+VEGF, respectivamente). Os índices cardíacos basais morfológicos e funcionais permaneceram inalterados na avaliação direta e pelo ECO entre os grupos enquanto que as medidas diretas de função cardíaca sob estresse farmacológico com a fenilefrina mostraram aumentos significativos no trabalho cardíaco e volume sistólico e diminuição na pressão diastólica final somente nos animais que receberam terapia celular que incluía VEGF. Em conjunto, os dados mostram que a terapia celular combinada com o aumento da expressão de fator angiogênico (VEGF) ou em combinação com fator de crescimento (IGF-1) tem efeito benéfico, uma vez que estes fatores estimularam a proliferação capilar e vascular podendo contribuir para o aumento da circulação colateral, reduzindo o tamanho do infarto e promovendo melhora cardíaca funcional.

Gonçalves, GA. Transplantation of genetically modified cardiac fibroblasts to induce angiogenesis and vasculogenesis in ischemic myocardium [thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo – Incor-HC/FMUSP; 2007.

The effect of modified cardiac fibroblasts (CF) expressing VEGF (*vascular endothelial growth factor*) and/or IGF-1 (*insulin-like growth factor*) associated to fibrin biopolymer to induce angiogenesis, vasculogenesis and improve cardiac function in ischemic cardiac tissue was tested. The direct injection of 10^6 CF genetically modified to express the reporter gene LACZ (AdRSVLACZ) indicated transgene expression up to 45 days. First, all groups were treated and 7 days later the animals were submitted to a 45 min cardiac ischemic injury. Twenty one days later VEGF protein and capillary density increased only in groups that received VEGF the groups: (VEGF protein: 1209.6 ± 11.4 vs. VEHICLE: 123.1 ± 5.2 , Cell: 104.2 ± 7.4 and Null: 73.2 ± 2.4 positive cells/field, $p < 0.01$ and capillary: 543.8 ± 52.1 vs. 349.2 ± 0.9 , 288 ± 19.0 and 245 ± 2.6 capillaries/ mm^2 , $p < 0.01$). Merged image of immunoassaying for endothelial and smooth muscle cells specific markers, were significantly greater in VEGF group suggesting maturation of newly formed vessels (45 ± 3 vs. 10 ± 2 , 8 ± 1 and 16 ± 3 , $p < 0.001$) and myocardial scar area was reduced in VEGF vs. VEHICLE ($3.0 \pm 1.3\%$ vs. $8.0 \pm 0.8\%$, $p < 0.05$). To test the therapeutic efficacy of this treatment, a second study was performed with groups: VEHICLE= control, POLYMER= fibrin biopolymer, CELL, NULL, IGF-1, VEGF and IGF-1+VEGF. Treatments were performed 24 hs following ligation of the descending coronary artery. After 4 weeks, VEGF and IGF-1 protein increased in IGF-1, VEGF and IGF-1+VEGF groups, $p < 0.0001$. We observed only in

VEGF groups an increase in capillary number and vascular density and reduction in myocardial collagen area ($35,12 \pm 7,05$ vs. $31,28 \pm 5,03$ vs. $30,07 \pm 6,21$ vs. $25,89 \pm 2,92$ vs. $15,43 \pm 2,02^*$ vs. $16,07 \pm 1,83\%^*$, $*p<0,05$, to groups VEHICLE, POLYMER, CELL, NULL, IGF-1, VEGF, IGF-1+VEGF, respectively). The morphological and functional basal cardiac indices remained unchanged in all groups, however, under pharmacologic stress using phenylephrine, the VEGF groups displayed significant improvement in cardiac work and stroke volume and a reduction in end diastolic pressure. Taken together, these results indicated that cardiac fibroblasts expressing VEGF alone or in combination with IGF-1 can induce angiogenesis and vasculogenesis in ischemic myocardium decreasing myocardial scar area and improving cardiac performance following coronary ligation.

1 . Introdução

1.1. INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM).

1.1.1. Epidemiologia

A insuficiência coronariana é definida como a inabilidade do coração para bombear sangue suficiente às demandas metabólicas do corpo. É uma condição patológica complexa e progressiva que envolve fatores genéticos e ambientais. Estima-se que 1-2% das populações europeia e americana são acometidas, sendo que nos Estados Unidos são diagnosticados 550 mil casos novos ao ano (Berry et al.,2001).

Atualmente no Brasil, a doença cardiovascular é considerada a primeira causa de óbito, reflexo do envelhecimento da população e da diminuição da mortalidade pelas doenças infecto-parasitárias (Bensenor et al.,2002). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, cerca de 20 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de doenças cardiovasculares, particularmente de infarto agudo do miocárdio (IAM), das quais 12 milhões são vítimas fatais (OMS, 2005).

Estima-se que o custo do tratamento de pacientes que foram acometidos por doenças cardiovasculares é de 1-2% do que é reservado anualmente para a Saúde em países desenvolvidos, representando cerca de 20 bilhões de dólares/ano. Apesar disso, o sucesso nos tratamentos ainda é modesto (Miller, 1990).

Frente a seu caráter emergente e ao acometimento de faixas etárias produtivas, tornam-se necessários investimentos em programas preventivos assim como para novos estudos sobre o desenvolvimento e o tratamento das doenças cardiovasculares.

Atualmente, o tratamento se baseia na utilização de medicamentos e em técnicas de revascularização cirúrgica ou por angioplastia. Porém, um grande número de casos avançados não se beneficia destas técnicas e as reestenoses são frequentes (Greeg, 1985; Tunis et al.,1991; Liew & Dzau, 2004). Há, portanto, a necessidade de estratégias terapêuticas alternativas e é nesse sentido que se investiga a utilização da terapia gênica para o tratamento da doença arterial aterosclerótica e de patologias associadas.

Ensaio clínico empregando técnicas de terapia gênica nas doenças cardiovasculares através de vetores virais (53%) ou não virais (47%) não estão dissociados de complicações clínicas, incluindo a morte, podendo inclusive ser atribuída ao vetor empregado (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>). Mesmo que estes estudos tenham envolvido pacientes em estado grave de doença vascular - isquemia periférica e isquemia miocárdica - refratárias às terapias convencionais, o acompanhamento clínico destes grupos de pacientes mostrou-se favorável quando se analisou a mortalidade cumulativa no período de um ano: 5,2% comparados com 11 – 13% para pacientes submetidos a revascularização transmiocárdica através de terapia a laser (Isner et al.,2001; Allen et al.,1995; Frazier et al.,1991).

1.1.2. Fisiopatologia do infarto agudo do miocárdio (IAM).

O IAM é considerado a patologia mais comum e a principal causa de morte no âmbito das doenças cardiovasculares e é decorrente da isquemia causada pela oclusão ou sub-oclusão de uma ou mais artérias coronárias. O aparecimento e a evolução da necrose isquêmica dependem basicamente da extensão e duração da isquemia, da intensidade de circulação colateral e do estado prévio do miocárdio (Liew & Dzau, 2004).

A isquemia no tecido cardíaco leva a alterações das fibras cardíacas, inicialmente reversíveis, entretanto caso não ocorra o restabelecimento do fluxo sanguíneo tais alterações tornam-se irreversíveis, culminando com a morte dos cardiomiócitos. Em humanos e em cães tais alterações são reversíveis se o fluxo sanguíneo for restaurado nos primeiros 15 a 20 minutos de oclusão da artéria coronária (Haunstetter et al., 1998).

As lesões iniciais praticamente só podem ser detectadas ao microscópio eletrônico. Nos primeiros minutos de isquemia observa-se edema intracelular, tumefação mitocondrial, perda de glicogênio citoplasmático, alargamento da banda I dos sarcômeros e discreta agregação da cromatina nuclear. No homem é possível observar os primeiros sinais macroscópicos e microscópicos da necrose a partir das primeiras duas horas de oclusão. A introdução de técnicas de dupla coloração facilitou a identificação macroscópica de áreas acometidas pelo infarto

(Nachas et al.,1963). Estas áreas são claramente distinguíveis e, portanto quantificáveis (Borges et al.,2006).

A deficiência sanguínea traduz-se principalmente em hipóxia e déficit metabólico. Sob tais circunstâncias, os cardiomiócitos tornam-se necróticos ou programam sua própria morte. Muitos trabalhos têm demonstrado que a principal perda de tecido cardíaco no IAM ocorre por apoptose (Olivetti et al.,1997; Haunstetter et al.,1998; Buja et al.,1998; Liew & Dzau, 2004).

A morte dos cardiomiócitos desencadeia a liberação de uma série de proteínas na corrente sanguínea, entre as quais troponina T e creatinofosfoquinase (CPK). A elevação temporal das concentrações plasmáticas dessas proteínas é usada para a detecção da condição de IAM e sua evolução (Liew & Dzau, 2004).

A evolução do IAM é marcada por uma resposta inflamatória aguda, desencadeada pelos cardiomiócitos necróticos que se inicia por infiltração de leucócitos. Os neutrófilos predominam nas primeiras horas sendo substituídos pelos monócitos em 24 a 48 horas. A fagocitose das células necróticas ou dos corpos apoptóticos, a reabsorção dos constituintes da matriz e o desencadeamento do processo de reparação através da liberação de várias citocinas e fatores de crescimento necessários à fibrose e a angiogênese, constituem as principais funções dos leucócitos num foco inflamatório. A reparação é iniciada com a invasão de miofibroblastos (fibroblastos residentes que são ativados em situação de hipóxia) e capilares na área infartada, levando a formação de um tecido fibroso rico em colágeno (Camelliti et al.,2005; Borges et al.,2006).

Estudos mais recentes mostram que durante a fase proliferativa dos miofibroblastos, estas células passariam a expressar determinadas proteínas de contração como a α -SMAc (α actina de musculatura lisa) e Smemb, um marcador de

diferenciação celular (isoforma embrionária da miosina de cadeia pesada). Desta forma, estas células assumiriam diferentes fenótipos dependendo da necessidade fisiológica, atuando principalmente no remodelamento cardíaco (Frangiannis et al.,2000).

Em humanos, dois a três dias após o IAM sem reperfusão, proteínas da nova matriz extracelular passam a ser depositadas, inicialmente na borda da área necrótica, entre o tecido infartado e o não infartado, mais tardiamente na zona central do infarto. Em ratos, quantidades significativas de colágeno tipo III podem ser encontradas dois a três dias após ligadura da artéria coronária. O pico de produção de colágeno tipo III é seguido de uma lenta e progressiva síntese de colágeno tipo I (Borges et al.,2006).

O mecanismo de compensação é caracterizado por remodelamento ventricular, processo caracterizado por progressiva expansão da área infartada e dilatação da cavidade ventricular esquerda culminando com disfunção ventricular esquerda e insuficiência cardíaca (falência cardíaca, dilatação ventricular, etc.) (Dib, 2006).

A resposta do coração a um evento isquêmico é limitada por alguns mecanismos compensatórios que tentam recuperar a sua função de bomba. Entre estes mecanismos, destaca-se a estimulação de receptores adrenérgicos, que aumentam a atividade inotrópica, cronotrópica e o retorno venoso, favorecendo o mecanismo de Frank-Starling (Moisés et al.,2000).

Em função da extensão da massa muscular perdida, o infarto do miocárdio tem como resultado imediato à diminuição do volume sistólico e do débito cardíaco e a elevação da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, dando início precocemente à disfunção do ventrículo esquerdo (Moisés et al.,2000).

Outro mecanismo compensatório é a hipertrofia dos cardiomiócitos viáveis restantes, podendo ser eficaz em curto prazo ao preservar a relação entre a massa do miocárdio e o

volume de sangue ejetado. Entretanto, este mecanismo tornar-se ineficaz em longo prazo (Frangigiannis et al.,2000).

Quando a zona acinética é superior a 20% da circunferência ventricular esquerda, consequência de infarto agudo de parede anterior do ventrículo esquerdo, os mecanismos compensatórios são insuficientes e a única forma de se manter o volume de ejeção do ventrículo esquerdo em valores normais é a alteração na geometria da cavidade ventricular (Moisés et al.,2000).

A infiltração das células inflamatórias no miocárdio isquêmico permite melhor reparo da lesão e menor remodelamento da cavidade ventricular, à medida que estas células desempenham papel crítico no processo de reparo, o que envolve reabsorção do tecido necrótico, liberação de citocinas e fatores de crescimento necessários na formação do tecido cicatricial (Weihrauch et al.,1995) e no processo de angiogênese (Arras et al.,1998; Schaper et al.,1999), aumentando assim a sobrevida pós-infarto (Simoons et al.,1986).

Embora a reperfusão seja a forma mais efetiva de se reduzir o tamanho do infarto, preservando a função ventricular, tanto no modelo animal como no homem (Stack et al, 1983; Jennings et al.,1993; Lavalle et al.,1983; Kloner et al.,1983; Koren et al.,1985; Jaffer et al.,2006) a reperfusão do miocárdio isquêmico gera alterações funcionais e histopatológicas próprias. Essas alterações constituem a chamada lesão de reperfusão.

A reperfusão da área isquêmica altera a evolução natural do IAM, da necrose à reparação. O restabelecimento do fluxo no tecido isquêmico, ao permitir a penetração de leucócitos através da circulação, acelera e amplia a reação inflamatória no local (Barros et al.,2000), alterando o padrão de necrose anteriormente observado.

Os efeitos danosos dos polimorfonucleares (PMNs) nos tecidos reperfundidos estão relacionados à sua ativação e subsequente geração de espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas, que além de lesarem o tecido cardíaco, contribuem para a disfunção da microcirculação observada em tecidos isquêmicos reperfundidos (Van Benthuisen et al.,1987, Mehta et al.,1989; Ku, 1992). Neutrófilos em estado ativado tornam-se mais rígidos e agregam-se uns aos outros, comprometendo a perfusão do tecido e a integridade de pequenos vasos e capilares (Engler et al.,1986). Nesse processo, há ainda a participação de plaquetas, que ao interagirem com os polimorfonucleares e o endotélio, acentuam os mecanismos de adesão e geram a liberação de PAF (*platelet activating factor*), leucotrienos, endotelinas e outros agentes vasoconstritores (Siminiak et al.,1995). Esses eventos participam da origem do fenômeno conhecido como “*no-reflow*” (hipofluxo progressivo em áreas reperfundidas), que tem como conseqüências lesão endotelial, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de proteínas plasmáticas, formação de edema, aumento da resistência vascular e possivelmente, extensão da necrose do tecido reperfundido. Romson et al.,(1983) demonstraram uma significativa redução do dano tecidual após oclusão arterial ao limitarem a ativação e a aderência de neutrófilos em tecidos isquêmicos através da depleção dos PMNs ou por inibição do recrutamento e adesão destas células ao endotélio vascular (Rossen et al.,1985; Engler et al.,1986; Simpson et al.,1988). Há relação entre a extensão das áreas de “*no-reflow*” e o grau de disfunção e remodelação ventriculares (Gerber et al.,2000).

Sob o aspecto funcional, a reperfusão da área isquêmica leva a uma disfunção sistólica transitória (“*stunning*”) (Jaffer,et al.,2006), que parece não estar relacionada diretamente com o acúmulo de leucócitos no miocárdio. Há muitos argumentos

relevantes nesse sentido, entre eles, o fato de que a reperfusão do miocárdio de cães submetidos à oclusão coronariana de curta duração (com tempo inferior a 10 minutos) não causa aumento significativo do acúmulo de leucócitos, mas observa-se disfunção pós-isquêmica (Jeremy et al.,1989). Embora todos esses efeitos possam contribuir para acentuar o dano miocárdico, o resultado final da reperfusão miocárdica é positivo no sentido da preservação do músculo em risco de necrose.

A mortalidade resultante do infarto do miocárdio está diretamente relacionada ao tamanho da zona afetada, o que levou os estudos para a obtenção de drogas e de procedimentos com o objetivo de redução da extensão do infarto. No entanto, o tempo necessário para a neovascularização após transferência de células transfectadas, ultrapassa o período de necrose, inviabilizando o “salvamento” do miocárdio agudamente isquêmico. Entretanto, a transferência de determinados fatores de crescimento na fase aguda do infarto do miocárdio parece proteger a área isquêmica através da inibição dos mecanismos relacionados a apoptose (Yaoita et al.,2000).

As intervenções cirúrgicas e não-cirúrgicas têm por finalidade impedir ou diminuir os danos causados pela obstrução coronariana. No entanto, em algumas situações clínicas, a anatomia das artérias envolvidas, a complexidade das lesões ateroscleróticas e as condições clínicas gerais do paciente, impedem a realização destes procedimentos.

O fluxo sanguíneo coronariano normal ou em disfunção, pode ser suplementado pela presença de circulação colateral, exercendo assim um efeito protetor no miocárdio isquêmico (Hansen, 1989; Sabri et al.,1991).

Em resumo, o IAM leva à perda de tecido e ao prejuízo do desempenho cardíaco. Assim, a melhor terapêutica para evitar o remodelamento é a regeneração dos cardiomiócitos bem como o estímulo a neovascularização dentro da área infartada.

1.2. ANGIOGÊNESE E FATORES ANGIOGÊNICOS.

O conceito atual sobre os complexos processos que envolvem o crescimento vascular, bem como os fatores que estão envolvidos em sua regulação, teve início em uma série de experimentos realizados no final dos anos 60, que resultaram em duas publicações de autoria de Folkman (Folkman et al.,1971a; Folkman et al.,1971b), hoje conhecido como o “mestre” da angiogênese moderna. Folkman (Folkman et al.,1971a; Folkman et al.,1971b) formulou a hipótese de que haveria uma interdependência entre crescimento tumoral e vascularização, que envolveria a participação de substâncias difusíveis, até então desconhecidas liberadas por células tumorais e com capacidade de estimular o crescimento de células endoteliais à distância. Após uma série de experimentos animais com diversas linhagens de células tumorais, em 1971, Folkman e seus colaboradores (Folkman et al.,1971a; Folkman et al.,1971b) conseguiram isolar, a partir de extratos de células ascíticas de tumor de *Walker* em ratos, uma substância capaz de estimular o crescimento de capilares *in vivo*, à qual chamaram de FATOR ANGIOGÊNICO TUMORAL ou TAF (*tumor angiogenic factor*) (Folkman et al.,1971a; Folkman et al.,1971b).

Em 1977, dois cientistas russos, Svet-Moldavsky e Chimishkyan, do Laboratório de Virologia do Centro de Pesquisa em Câncer de Moscou, contrariando suas próprias investigações sugeriram aos editores do *The Lancet* que:

“O fator angiogênico tumoral de Folkman poderia ser usado para indução de vascularização em tecidos isquêmicos e infartados (particularmente, no infarto do miocárdio)” (Svet - Moldavshy & Chimishkyan, 1977).

1.2.1. Angiogênese terapêutica.

A possibilidade de aplicação terapêutica de fatores de crescimento vascular ganhou impulso quando Vallee e seus colaboradores (1985) isolaram e caracterizaram bioquimicamente um fator angiogênico tumoral, determinaram sua seqüência de aminoácidos e clonaram o gene responsável por sua produção. A possibilidade de sua aplicação clínica em situações diversas como na cicatrização de feridas, no infarto do miocárdio e no acidente vascular encefálico foi consistentemente considerada. Finalmente Höckel e seus colaboradores (1993), propuseram o termo ANGIOGÊNESE TERAPÊUTICA, assim definido:

“Nós sugerimos o termo angiogênese terapêutica para intervenções que objetivem a indução ou estimulação do crescimento local de vasos sanguíneos como princípio terapêutico para aquelas condições clínicas caracterizadas por hipovascularidade” (Höckel et al.,1993).

A partir deste momento, dava-se início a uma era de grandes avanços no recém surgido campo da Angiogênese Terapêutica, todos resultantes da integração de conhecimentos de Fisiologia Vascular e Biologia Molecular, culminando na sua aplicação clínica em meados da década de 90.

1.2.2. Vasculogênese e angiogênese.

Do ponto de vista celular, a formação de um vaso pode ocorrer por dois fundamentais e diferentes processos denominados ANGIOGÊNESE e VASCULOGÊNESE (Risau, 1988; Risau, 1997).

A “angiogênese” é o termo que descreve o crescimento vascular por brotamento, divisão celular, migração e organização de células endoteliais a partir de vasculatura pré-existente (Risau, 1997; Folkman, 2003). De fundamental importância para o desenvolvimento vascular embrionário, a angiogênese é fenômeno incomum no adulto (Folkman, 2003). Ocorre fisiologicamente no sistema reprodutor feminino, durante o ciclo menstrual, e na placenta, durante a gestação (Reynolds & Redmer, 2001). Além

disso, participa de processos reparadores, como na cicatrização de feridas (Tonnesen et al.,2002). A neoformação vascular, entretanto, está intimamente ligada ao aparecimento, desenvolvimento e progressão de várias doenças, como a retinopatia diabética (Sharp, 1995), artrite reumatóide (Koch, 2000), psoríase (Creamer & Barker, 1995) e em crescimento de tumores sólidos (Folkman, 1995).

O processo de crescimento vascular prevê uma série de eventos que ocorrem de maneira seqüencial, em tempo e espaço (Folkman, 1992), envolvendo células endoteliais e pericitos (D'Amore, 1992), além da própria matriz extracelular. Após a ativação das células endoteliais e dos pericitos, alterações morfológicas ocorrem nestas células; as células endoteliais ativadas produzem proteases (por exemplo, colagenases e o ativador de plasminogênio tecidual), responsáveis pela degradação da membrana basal. Fatores quimiotáticos e mitógenos produzidos por vários tipos celulares indicam a sinalização para o brotamento, migração e proliferação endotelial. O término da diferenciação celular endotelial está associado ao restabelecimento do fenótipo de quiescência celular, caracterizado pela cessação da proliferação e migração celulares, redefinição do contato célula-célula e formação da luz do vaso. Em seguida, os pericitos migram na direção da superfície externa da estrutura vascular recém-formada; ocorre então, a síntese e deposição de uma nova membrana basal, o que marca os estágios finais do processo de maturação do vaso. Com o início do fluxo sanguíneo no interior do vaso recém-formado, estabelece-se sua integração funcional ao sistema colateral (Risau, 1988).

Já, o termo “vasculogênese” foi definido por Risau (1988) com o oposto do termo “angiogênese”. Em sua clássica revisão na *Revista Nature*, em 1997, Risau explicou que a “vasculogênese” ocorre durante a vida embrionária, a partir de células

mesodérmicas precursoras, os angioblastos, dizendo ainda que não havia evidências diretas de vasculogênese posnatal (Risau, 1997). A suposição de que a vasculogênese ocorria somente durante a fase embrionária persistiu por muito tempo nos ambientes acadêmicos, assim como em livros texto de histologia. Isso é baseado no conceito de que uma vez que o sistema endotelial vascular é formado, a angiogênese passa a ser o mecanismo de regeneração vascular predominante durante a vida, assim como durante a morfogênese posnatal cíclica (fisiológica) e patológica (Komarova & Mironov, 2005).

O conceito de vasculogênese posnatal começou a aparecer na segunda metade da década de 90. De acordo com Folkman (1995):

“Vasculogênese posnatal nunca havia sido observada, mas não deveria ser nenhuma surpresa se fosse descoberta em tumores”.
(Folkman, 1995).

A situação mudou dramaticamente após a publicação do artigo de Asahara em 1997 (Asahara et al.,1997) sobre a identificação, isolamento e potencial angiogênico das células progenitoras endoteliais circulantes. Esta foi a primeira publicação que “clareou” e evidenciou a vasculogênese posnatal. Desde então, o número de publicações a esse respeito cresceu absurdamente (Asahara et al.,1999; Drake, 2003, Ribatti et al.,2003, Rabbany et al.,2003; Bolontrade et al.,2002).

1.2.3. Fatores angiogênicos e de crescimento.

Os eventos envolvidos no crescimento vascular são modulados por CITOCINAS ANGIOGÊNICAS (Yancopoulos et al.,2000) (fatores de crescimento vascular ou, simplesmente fatores de crescimento), algumas com propriedades pró-angiogênicas e outras com propriedades anti-angiogênicas (Conway et al.,2001) (TABELA 1).

Essas citocinas são liberadas por vários tipos celulares em resposta a diversos estímulos angiogênicos, como hipóxia tecidual e forças mecânicas, como as de cisalhamento (“*shear stress*”). A baixa tensão tecidual de O₂, deflagra uma coordenada resposta angiogênica pela indução de expressão de VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilina-1, neuropilina-2, Ang2, NO-sintase, TGFβ-1, PDGF-BB, endotelina-1, IL-8, IGF-1, Tie-2, COX2, entre outros (Semenza, 1998).

A existência de um complexo transcricional composto por fatores induzíveis pela hipóxia (HIF, *hypoxia inducible factors*) – HIF-1α, HIF-1β e HIF-2α – leva à supressão de muitos genes envolvidos na angiogênese, na presença de hipóxia (Liu et al.,1995; Semenza, 1998). Além do aumento de expressão de citocinas angiogênicas, a hipóxia também promove um aumento na expressão local de receptores celulares para esses fatores de crescimento, explicando assim a presença de crescimento vascular preferencialmente em sítios de isquemia (Brogi et al.,1996).

Há ainda que se considerar as forças de cisalhamento (“*shear stress*”) causadas pelo fluxo sanguíneo que afetam o desenvolvimento da circulação colateral tanto em

condições fisiológicas como patológicas (Unthank et al.,1996), através da participação de fatores de transcrição (c-Fos e Erg-1), enzimas (ECA e No-sintase), fatores de crescimento (PDGF-a e Bb, IGF-1, TGF- β) e moléculas sinalizadoras (integrinas e moléculas de adesão) (Topper & Gimbrone, 1999).

TABELA 1 – CITOCINAS ANGIOGÊNICAS

PROCESSO	ESTIMULADORES	INIBIDORES
VASCULOGÊNESE	VEGF, GM-CSF, β FGF, IGF-1	?
ANGIOGÊNESE	VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Ang-1, Ang-2, Tie2, FGF, PDGF, IGF-1, HGF, TNF α , TGF β -1, α v β 3, α 5 β 3, PA, MMP, PECAM, VE-cad, NO, CXC, HIF-1 α , COX2, IL-8	TSP-1, TSP-2, endostatina, angiostatina, vasostatina, PFS, IFN γ , IFN β , IL-12, IL-4, Id1, Id3, TFPI, VEGFL, TIMP, PEX, IP-10

1.2.4. VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e IGF-1 (*Insulin Like-Growth Factor*).

O gene **VEGF** está localizado no braço curto do cromossomo 6 e é composto de 8 éxons que são transcritos em 4 isoformas maduras: VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 e VEGF 206 (Tisher et al.,1996). A designação numérica das isoformas denota o número de aminoácidos na molécula. Também há mais duas isoformas que não são comumente expressas: VEGF 145 e VEGF 183 (Neufeld et al.,1999). A isoforma

predominante é a VEGF 165 e está superexpressa em vários tumores sólidos. Recentemente, foi demonstrado que a essa isoforma era um importante indicador biológico de recorrência de carcinoma hepatocelular pós-cirúrgico (Otrock et al.,2007).

A família VEGF compreende sete glicoproteínas que são secretadas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PIGF (*placental growth factor*) and VEGF-F (Ferrara et al., 2006).

Os VEGFs exercem seu papel biológico através de interações com seus receptores. Esses receptores são tirosino-quinases transmembranas: *VEGF receptor-1* (VEGFR-1; Flt-1) e *VEGF receptor -2* (VEGFR-2; Flk-1), seletivamente expressos em células vasculares endoteliais, e os receptores neurolipinos (NP-1 e NP-2), são expressos no endotélio vascular e em neurônios (Dvorak, 2002).

Os VEGFs e seus receptores exercem papel importante no desenvolvimento do sistema vascular, via mecanismos angiogênicos e vasculogênicos, assim como na formação do sistema linfático vascular (Ferrara, 2004). Essas moléculas estão envolvidas em processos de reparação tissular, assim como na reconstrução do endométrio feminino pós-menstruação. Também estão envolvidos em muitos processos de evolução de tumores metastáticos (Madriota et al.,2001). Controlados esses processos, essa molécula vem sendo alvo de pesquisas recentemente, principalmente em casos de IAM ou usadas diretamente como tratamento da doença (Isner et al.,2001; Arsic et al.,2004; Becker et al.,2006; Yau et al.,2007). As terapias anti-VEGF continuam sendo realizadas para o entendimento do processo de angiogênese, assim como para quebrar paradigmas sobre VEGF e seus receptores.

O gene **IGF-1** tem 70 resíduos de aminoácidos e é o fator de crescimento fundamental na regulação da proliferação e diferenciação celular (Horio et al.,2005).

Estruturalmente é homólogo à insulina. Sua síntese se dá principalmente no fígado, mas pode ocorrer em outros tecidos (Delafontaine, 1995). Muitos estudos *in vivo* têm demonstrado que a expressão do IGF-1 é aumentada no coração em situações clínicas com hipertensão arterial e IAM (Wählander et al.,1992; Donohue et al.,1994; Cheng et al.,1996). Outros estudos mostram que o IGF-1 exógeno aumenta síntese de proteínas em miócitos cardíacos e promovem proliferação e produção de colágeno em fibroblastos cardíacos (Ito et al.,1993, Decker et al.,19995, Foncea et al.,1997). Esses achados sugerem que o IGF-1 pode exercer papel importante na hipertrofia cardíaca ou no remodelamento em algumas situações patológicas. Estudos recentes sugerem um papel cardio-protetor (Gaussin & Depre, 2005).

Os IGFs (I e II) promovem um suporte trófico para vários tipos celulares, inibindo morte celular por apoptose através de sinalização mitocondrial (caminho intrínseco) ou por antagonizar a ativação da sinalização de citocinas citotóxicas (caminho extrínseco) (Wang et al.,1998; Van Golen et al.,2000). Em algumas situações os IGFs também protegem contra outras formas de morte celular como a necrose ou autofagia (Alexa et al.,2004).

Em adição, IGF-1 pode induzir a ativação de HIF-1 e a secreção de VEGF tanto *in vivo* como *in vitro*, promovendo uma sinergia entre os fatores VEGF e IGF-1 (Slomiany & Rosenzweig, 2004).

1.3. ANGIOGÊNESE TERAPÊUTICA COMO TRATAMENTO DA DOENÇA ARTERIAL OCLUSIVA.

O conceito de induzir a formação de circulação colateral como forma de tratar ou prevenir as complicações da doença arterial isquêmica partiu da observação clínica e arteriográfica do desenvolvimento espontâneo de vasos colaterais preservando a função ventricular em pacientes com doença coronariana isquêmica grave (Slunga et al.,1989). O grau de formação de vasos colaterais está entre os principais determinantes da extensão da necrose após isquemia da artéria coronária (Habib et al.,1991).

A angiogênese cardíaca representa a formação de novos capilares pelo aumento do número de células nos microvasos já existentes e ocorre como parte de um processo natural seguido da injúria isquêmica (Meoli et al.,2004).

As bases moleculares da angiogênese podem ser divididas em etapas. Inicialmente, ocorre uma vasodilatação dos vasos pré-existentes, mediada por óxido nítrico (Kimura et al.,2000), que apresenta ação potencializadora na transcrição e produção do VEGF. O VEGF é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, pela redistribuição de moléculas de adesão intracelulares, incluindo PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecules - 1*) ou caderinas e alterações em estruturas de membranas celulares por ação direta sobre várias quinases (Esser et al.,1998).

A neovascularização estimulada pelo VEGF é observada em importantes contextos clínicos, incluindo a isquemia miocárdica (Arsic et al.,2004), retinopatias

(Aiello et al.,1994) e neoplasias (Plate et al.,1992). O VEGF está entre os mediadores de neovascularização mais bem caracterizados (Leung et al.,1989; Tisher et al.,1989; Ferrara et al.,1999). Vários estudos indicam que a expressão de VEGF e seus receptores, flk-1 eflt-1, estão relacionados a condições de hipóxia (Yancopoulos et al.,2000; Pachori et al.,2004), exercendo papel-chave na formação de vasos colaterais em modelos experimentais de isquemia.

A ativação de um único fator como, o VEGF, talvez tenha papel limitado na formação de novos vasos em situações fisiológicas, uma vez que a angiogênese é um processo complexo e dependente de um grande número de substâncias ativas reguladas no espaço e no tempo. No estudo de Pettersson et al (2000) foi demonstrado que nas musculaturas esquelética e cardíaca normais, a formação de vasos funcionais induzidos por VEGF foi transitória sendo que em poucos dias os novos vasos desapareceram. Entretanto, em situações patológicas esta limitação pode não ser tão importante, pois o organismo estaria produzindo uma série de citocinas e o agente terapêutico, mesmo que isoladamente, poderia contribuir para potencializar a resposta em curso. Em conjunto, estes resultados ilustram alguns dos aspectos desta complexa resposta que deverão ser claramente dominados para que este conhecimento possa ser utilizado na prática clínica.

No IAM há uma elevação significativa de diversos fatores, como por exemplo, a elevação da concentração de IGF-1 e FGF (*fibroblast growth factor*) no tecido cardíaco, concomitante ao aumento de fluxo na circulação colateral, neovascularização e hipertrofia peri-infarto (Olivetti et al.,1997; Haunstetter et al.,1998; Buja et al.,1998; Li et al.,1999).

O IGF-1 exerce papel importante durante o desenvolvimento, crescimento e manutenção da estrutura e função das células cardíacas. A administração de IGF-1 em animais de experimentação ou em humanos possui efeitos hemodinâmicos benéficos

como aumento da contratilidade cardíaca e diminuição da resistência vascular periférica total. Estudos em pacientes com cardiomiopatia dilatada mostram uma correlação negativa entre a concentração sérica de IGF-1 e a gravidade da doença. No IAM o IGF-1 está envolvido na hipertrofia de cardiomiócitos (Duerr et al.,1995).

1.4. A TERAPIA GÊNICA E A DOENÇA ARTERIAL OCLUSIVA.

O avanço das técnicas de biologia molecular que possibilitaram a transferência de genes para células de mamíferos na década de 80 criou oportunidades para o desenvolvimento de novos tratamentos, entre eles a terapia gênica (Mulligan et al.,1990). A terapia gênica é simples e elegante enquanto conceito, consistindo em transferir um ou mais genes capazes de complementar uma deficiência celular. Os vetores virais são excelentes veículos para a transferência de genes exógenos, podendo chegar a 100% de eficiência de transdução, o que não se observa nas outras metodologias (Mulligan et al.,1993; Miller et al.,1990; Geutskens et al.,2000), além de abrir enormes perspectivas para a saúde humana.

A dificuldade de obtenção de determinados vetores virais em grande escala e, sobretudo a dificuldade de se obter vírus deficientes em replicação faz com que apenas alguns tipos de vírus sejam utilizados na terapia gênica (Miller et al.,1990, Smith et al.,2002). Atualmente, os vetores retrovirais e adenovirais são os mais utilizados.

É fundamental considerar a segurança e os riscos que cada um dos vetores oferece. O uso do adenovírus está associado a uma eficiente expressão gênica e uma alta imunogenicidade. Mesmo que sua aplicação clínica à injeção direta em tumores onde o

efeito local é desejado, as respostas imunes e inflamatórias sejam benéficas (Geutskens et al.,2000), nem sempre este é o caso, pois a resposta imune pode reduzir o tempo de expressão da proteína exógena, ou simplesmente bloqueia a reaplicação do vetor (Isner, et al.,2001). Sendo assim, foram desenvolvidos vetores derivados de adenovírus de nova geração que apresentam pouca, ou nenhuma, indução de resposta imune. De qualquer forma, este tipo de vetor é atualmente o mais empregado em ensaios clínicos empregando a terapia gênica (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>).

A administração de vetores virais em pacientes submetidos à terapia gênica confere alguns riscos para os indivíduos, mas há várias novas abordagens que estão sendo propostas para minimizar estes riscos. Dentre estas, a transferência gênica com objetivos terapêuticos utilizando vetores virais através de processo *ex vivo* pode ser considerada mais segura e eficiente. Esta metodologia consiste na transfecção de células mantidas em cultura empregando diferentes vetores virais, para posteriormente serem implantadas no órgão-alvo. Há que se considerar que estas células transfectadas *ex vivo* podem levar à liberação sustentada e prolongada do transgene em tecidos específicos, sobretudo no caso de vetores retrovirais. Um outro risco, porém, comum a todos os vetores, é o de transformação maligna do tecido alvo. Este risco é maior para os vetores com capacidade de se integrar ao DNA genômico e menor para adenovírus e plasmídeo-DNA (Russel, 2000).

O tempo de duração da expressão do transgene é um fator importante. Se por um lado o tratamento da maioria das doenças genéticas exige a expressão do gene terapêutico por longos períodos, há outras situações em que a expressão apenas transitória do transgene é suficiente como em programas de tratamento envolvendo eritropoietina ou citocinas indutoras de angiogênese, pequenas quantidades dessas

proteínas são suficientes para o efeito clínico desejado (Bohl, 2000) e no estudo de Mori et al (2001), que descreveram a inibição de neovascularização coroidal através da injeção intravenosa de vetor adenoviral expressando endostatina. De fato, excesso desses transgenes pode levar a poliglobulia (pela eritropoietina) (Villevall et al.,1994) ou formação de hemangiomas (pelo VEGF) (Carmeliet, 2005).

Um outro aspecto crítico é o tecido a ser tratado, já que alguns vetores necessitam de divisão celular para que a transdução seja eficiente (Williams et al.,2000). Por exemplo, vetores retrovirais são eficientes na transferência de genes para células-tronco hematopoiéticas (Williams et al.,2000). Contudo, estes vetores possuem capacidade limitada para transferir genes para tecidos diferenciados tais como o fígado, músculo e sistema nervoso, que não se encontram em divisão celular. Nessa classe incluem-se os vetores derivados de lentivírus, adenovírus, AAV (vírus adeno-associado) ou o plasmídeo-DNA (Debyser, 2003, Chuah et al.,2003).

Estudos em animais de experimentação mostraram que a regeneração do miocárdio isquêmico, através do implante de fibroblastos cardíacos, previamente transfectados com o gene MyoD (myogenic determination factor), representa uma alternativa para melhorar a função cardíaca pós-infarto, uma vez que estas células, ao expressarem este transgene passariam por um processo de diferenciação celular, isto é, fibroblastos cardíacos seriam transformados em cardiomiócitos. Entretanto, a frequência da diferenciação celular foi baixa (Murry et al.,1996).

Outra abordagem que vem sendo utilizada em terapia gênica é a introdução de dois vetores virais no mesmo tecido. Jones et al (2001) observaram que após injeção destes vetores em um modelo animal de úlcera gástrica resultou na expressão transitória de ambos os transgenes, levando a uma cicatrização mais rápida, formação de vasos

mais maduros e reparo mais adequado da anatomia glandular gástrica. Este estudo mostra a possibilidade do uso concomitante de dois vetores virais e consequentemente de dois tipos de fatores: angiogênicos e de crescimento. Assim, a administração simultânea de vetores virais como, por exemplo, de VEGF e IGF-1, tem o potencial de desenvolver circulação colateral com vasos íntegros e bem formados, significando um ganho potencial na recuperação do coração.

1.6. A TERAPIA GÊNICA ASSOCIADA À TERAPIA CELULAR.

Outra estratégia utilizada para reparo funcional do tecido cardíaco é o transplante celular utilizando, por exemplo, mioblastos esqueléticos (Udelson et al.,2000; Freedman & Isner 2002; Becker et al.,2006), células musculares lisas (Lee et al.,2000), células hematopoiéticas de medula óssea (Penn et al.,2002), e células tronco de medula óssea (Penn et al.,2002). Com o objetivo de diminuir a lesão isquêmica miocárdica, seria importante, além de repovoar o tecido cardíaco com o transplante celular, produzir novos vasos ao redor da área isquêmica.

Uma estratégia muito promissora é a associação de terapia celular com a terapia gênica, considerando a redução da possibilidade da interação do vírus com as células do próprio tecido e com o organismo.

Dados de nosso laboratório demonstraram que mioblastos esqueléticos superexpressando VEGF diminuem a lesão causada pelo infarto do miocárdio através da indução de novos vasos na área infartada (Becker et al.,2006). Apesar da existência do

grande número de estudos utilizando mioblastos esqueléticos e células de medula óssea, existem poucos estudos em que o fibroblasto é utilizado.

No tecido cardíaco, os cardiomiócitos correspondem a 30-40% do número total de células residentes, sendo que a maioria das células remanescentes são predominantemente fibroblastos (Camelliti et al.,2005).

Recentemente, vários estudos indicaram que a morte dos fibroblastos pode estar envolvida em disordens cardíacas, como a cardiomiopatia dilatada (Kohl et al.,2005; Squires et al.,2005; Freedman & Isner, 2002).

O uso de fibroblastos cardíacos pode ser considerado como uma estratégia interessante, já que estas células são de fácil obtenção, são transduzidas facilmente por vetores adenovirais e podem ser administradas em pacientes sem terapia imunossupressora (Johnsson et al.,2004; Johnsson et al.,2005).

2 . Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de fibroblastos geneticamente modificados para expressar VEGF e ou IGF-1 na estimulação da angiogênese e vasculogênese no tecido cardíaco isquêmico e assim atenuar os efeitos associados à lesão de isquemia e reperfusão e lesão de isquemia permanente no rato.

Especificamente:

1. Avaliar o aumento da densidade capilar e vascular e os efeitos sobre a extensão e progressão do infarto do miocárdio, através do implante de fibroblastos cardíacos transfectados com vetor adenoviral contendo VEGF e em combinação com IGF-1.
2. Utilizar os modelos de isquemia seguida de reperfusão, e o de isquemia permanente no miocárdio de ratos e avaliar a resposta cardíaca à terapia celular e de células modificadas por vetor adenoviral.

3 . Materiais e Métodos

3.1. Vetores Virais.

Foram utilizados os seguintes vetores virais:

- ***AdRSVLacZ e AdRSVVEGFP***

Os vetores adenovirais do tipo V contêm na região E1 de seu genoma o cDNA do gene da enzima de expressão nuclear beta galactosidase (*AdRSVLacZ*) da *Escherichia coli* ou, no caso do *AdRSVVEGFP*, simultaneamente o gene de expressão nuclear do fator angiogênico VEGF e o gene repórter da expressão de membrana EGFP, precedido pelo promotor RSV (*Rous sarcoma virus*) que foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr Carlos Frederico Martins Menck, ICB-USP/SP (Davidson et al.,1994).

- ***AdCMVIGF-1EGFP e AdCMVNull***

O vetor adenoviral do tipo V contém na região E1 de seu genoma simultaneamente os cDNAs do gene do fator de crescimento IGF-1 e o gene repórter da expressão de membrana EGFP (AdCMVIGF-1EGFP). Já, o vetor adenoviral AdCMVNull não apresenta cDNA na região E1 de seu genoma, sendo considerado um “Vetor Fechado”. Ambos os vetores virais são precedidos pelo promotor CMV (*Citomegalovirus*) e foram construídos em nosso laboratório.

AdCMVIGF-1/EGFP

O vetor AdCMVIGF-1/EGFP foi construído em nosso laboratório a partir do vetor pSKSP-IGF-1 cedido gentilmente por Dr Fred H. Gage (Laboratory of Genetics, The Salk Institute for Biological Studies, USA).

O cDNA do gene do IGF-1 humano foi liberado do vetor pSKSP utilizando-se as enzimas de restrição Kpn I e Sac II (Figura 1A). O inserto resultante de 800pb foi clonado no sentido senso ao promotor forte do citomegalovirus CMV e anterior à sequência IRES (Internal Ribosome Entry Site do vírus da encefalomiocardia - ECMV), no sítio de múltipla clonagem (MCN) do vetor pSHIRES-EGFP (Figura 2 A e B) (Lima-Bessa et al.,2006). O plasmídeo resultante da clonagem anterior, contendo o IGF-1 foi

digerido com SST II originando um fragmento de 6.3Kb (vetor + inserto linearizado) (Figura 1B). Este plasmídeo apresentava o cDNA do IGF-1 seguido da seqüência IRES, do cDNA da proteína verde fluorescente intensificada (EGFP) e da seqüência poli A de SV40. Esta construção permitiu que o IGF-1 e o gene repórter EGFP fossem expressos a partir de um mesmo mRNA bicistrônico (Jackson et al.,1990) (Figura 2). A construção resultante desta clonagem foi submetida a uma dupla digestão com as enzimas (*PI-Sce I* e *I-Ceu I*), liberando o inserto com o cassete de expressão, gerando um fragmento que foi clonado no vetor pAdeno X (*Adeno-XTM Expression System, da Clontech[®]* - adenovírus tipo 5) (Figura 1C). O produto da clonagem anterior foi digerido com *SwaI* a fim de linearizar os vetores não-recombinantes. A construção adenoviral recombinante foi então clivada com a enzima *Pac I* para expor as ITRs (*Inverted Terminal Repeats*) e o sinal de encapsidação do adenovírus, além da eliminação de seqüências bacterianas. Cinco microgramas do produto da digestão enzimática anterior foi transduzida em 1×10^6 células, oriundas de rim de embrião humano (293 HEK). Estas células possuem a região E1A do adenovírus tipo 5, integrado em seu genoma, o que permitiu o empacotamento e a replicação das partículas virais. O método de transdução utilizado foi o de precipitação com fosfato de cálcio (*CalPhos Mammalian Transfection Kit-Clontech[®]*). Durante um período de 10 dias, as células transduzidas foram observadas em microscópio de fluorescência para detecção da expressão de EGFP e ocorrência de efeito citopático (CPE). O material obtido da cultura celular, contendo os vírus recombinantes 10^4 partículas virais/mL foi adicionado em tubos de congelamento e estocado a -80°C . Esse procedimento foi realizado conforme metodologia descrita por Mizuguchi et al (1998 e 1999) (Figura 2 A e B - Representação esquemática de todas as etapas da obtenção do vetor viral).

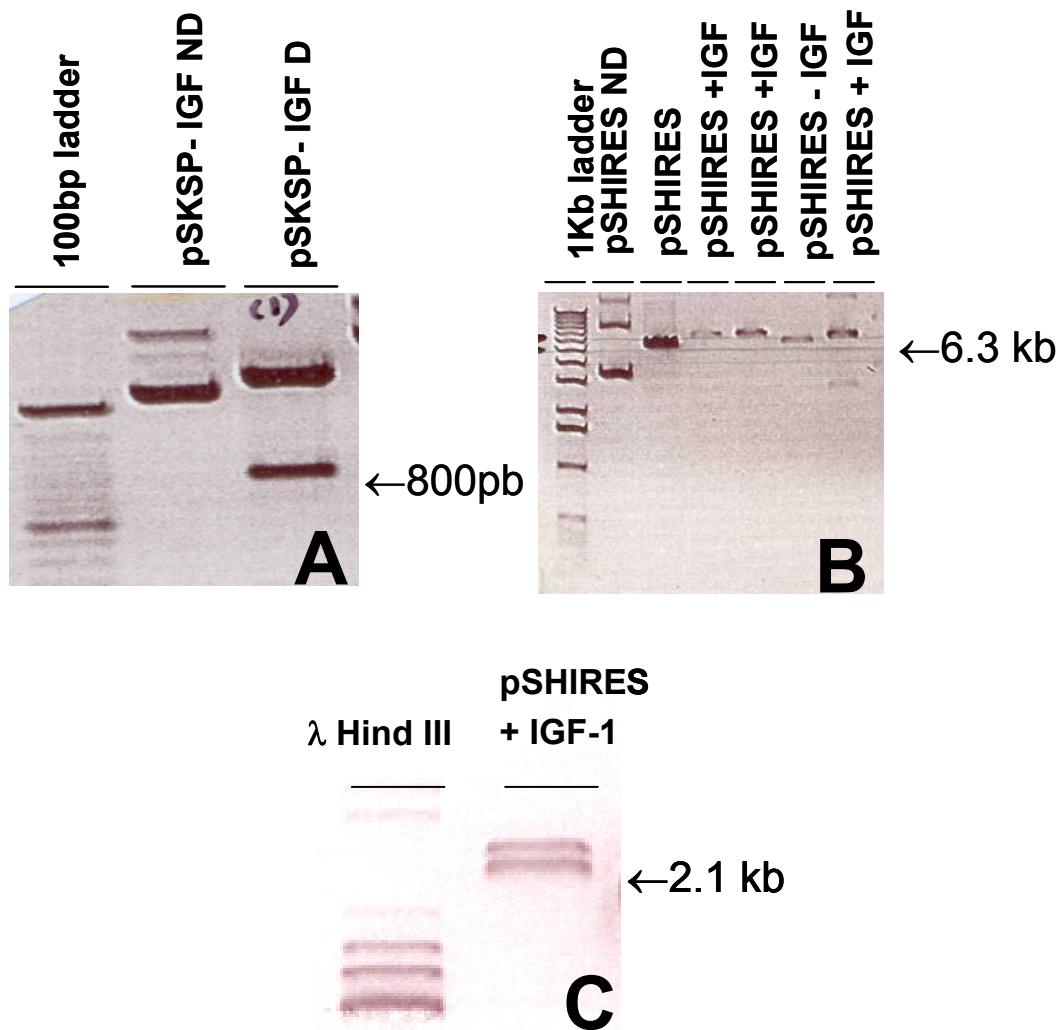
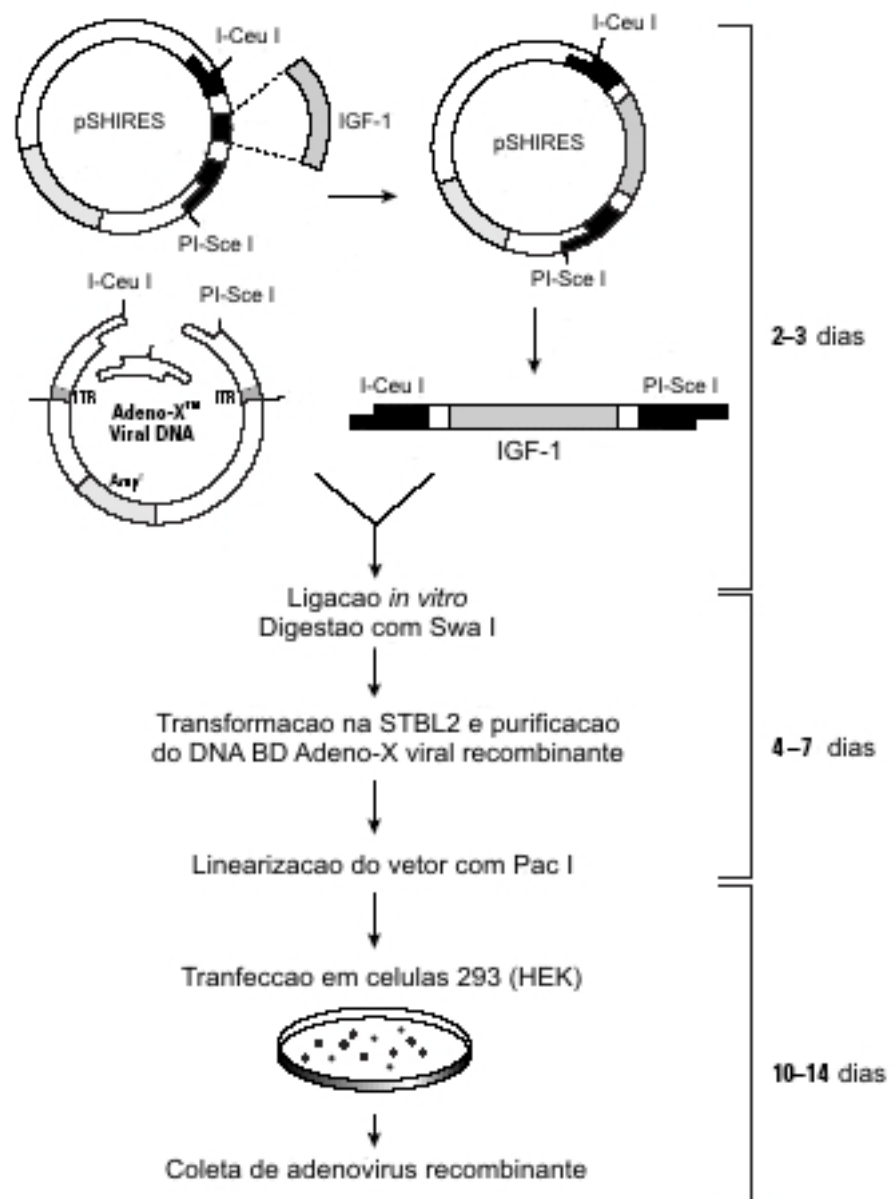


Figura 1. (A) Representa gel de eletroforese da digestão do vetor pSKSP- IGF-1 com as enzimas de restrição Kpn I e Not I, liberando fragmento de aproximadamente 800pb. DNA Ladder de 100pb foi utilizado como marcador de peso molecular; ND = não digerido; D = Digerido. (B) Representa gel de eletroforese dos clones da ligação do vetor pSHIRES + IGF-1 com as enzima de restrição SSTII. A linearização do vetor pSHIRES + IGF-1 deu origem a um fragmento de 6.3Kb. DNA Ladder de 1kb foi utilizado como marcador de peso molecular; ND = não digerido; D = Digerido. (C) Representa gel de eletroforese da digestão da ligação do vetor pSHIRES + IGF-1 com as enzima de restrição PI-Sce I e I Pceu I. A linearização do vetor pSHIRES + IGF-1 deu origem a um fragmento de 2.1Kb. DNA Ladder de 1000pb foi utilizado como marcador de peso molecular; ND = não digerido; D = Digerido.

A



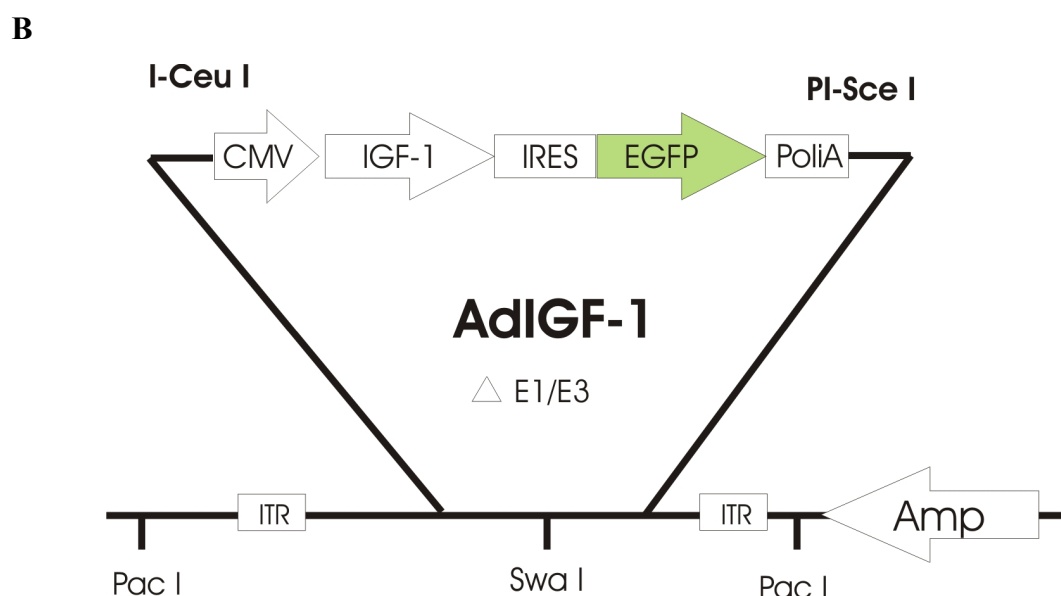


Figura 2: (A) Representação esquemática das etapas da clonagem do IGF-1 nos diferentes vetores (pSHIRES e pAdeno X), bem como da obtenção das partículas virais em células 293 HEK. (B) Esquemática da construção do IGF-1 /EGFP.

- **Propagação dos vetores virais**

A transdução dos vetores virais (utilizados neste trabalho) em células empacotadoras (HEK 293) resultou em alterações morfológicas que foram visualizadas em microscópio óptico. As alterações morfológicas, denominadas de efeito citopático, foram observadas após 48 horas da transdução. Como controle da eficiência da transdução foram utilizadas células HEK 293 mantidas sob as mesmas condições experimentais, exceto pela ausência do vetor viral (exemplo de infecção viral pelo AdCMVIGF-1EGFP, Figura 3).

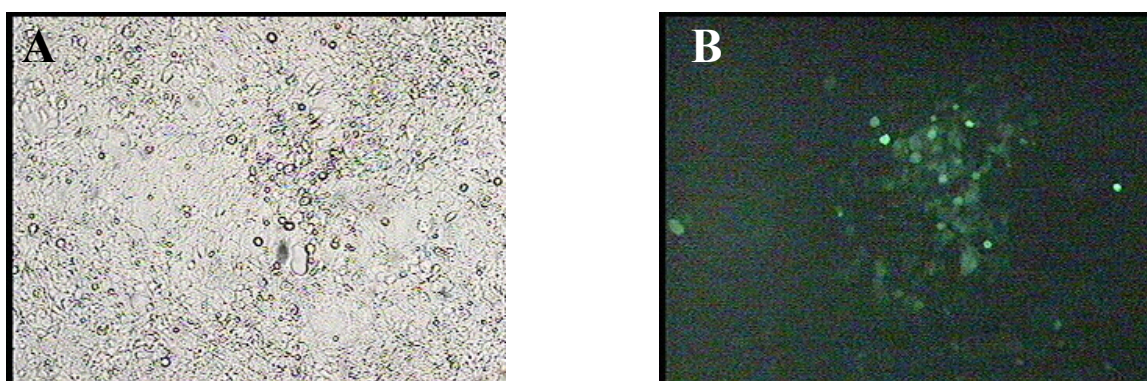


Figura 3: O quadro (A) representa o efeito citopático causado pela transdução do vetor em células HEK293. O quadro (B) representa as células HEK293 observadas em microscópio de fluorescência.

- **Titulação Viral**

O título das soluções estoque de vírus, expresso em gtu/mL (gene transfer unit) foi aproximadamente de 1×10^9 gtu/mL. A concentração da solução contendo os vetores virais (Ad₅CMVIGF1/EGFP) foi capaz de infectar 100% das células satélites a serem implantadas no coração de rato após 12 horas de contato (vírus/célula). A constatação da infecção foi realizada a partir da visualização da proteína verde fluorescente (EGFP) através de observação direta em microscópio de fluorescência. A obtenção de soluções de alto título é de grande importância quando se utiliza vetor viral para transdução *ex vivo*, pois o nível de expressão gênica *in vivo* depende do número de células modificadas, portanto a taxa de transferência gênica depende quase que exclusivamente do título viral.

3.2. Animais.

Foram utilizados ratos isogênicos machos Lewis, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB – UNICAMP) com idade entre 10 - 14 semanas. Para a obtenção da cultura primária de fibroblastos cardíacos e provenientes de músculo esquelético e mioblastos esqueléticos foram utilizados ratos Lewis adultos com peso entre 300 e 350g. Os animais foram mantidos em biotério de manutenção do Instituto do Coração (INCOR) da FMUSP, com temperatura ambiente entre 22-24°C e com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro-escuro).

3.3. Cultura primária de fibroblastos cardíacos e de músculos esqueléticos de ratos adultos.

Em cada extração de fibroblastos cardíacos e de músculos esqueléticos foram utilizados de 5 a 6 ratos adultos Lewis que foram submetidos à eutanásia por overdose anestésica com pentobarbital sódico (80mg/kg). Após constatação da parada cardíaca, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e uma incisão cutânea transversal foi feita estendendo-se por todo tórax do animal ou estendendo-se pelos membros inferiores; o coração ou os músculos gastrocnêmios foram retirados e transferidos para um tubo

plástico contendo solução gelada de PBS/PS. Os corações e músculos foram transferidos para placa de petri em fluxo laminar e seccionados. Para fibroblastos cardíacos, o tecido seccionado foi transferido para tubo plástico contendo solução de colagenase tipo 2 e tripsina e mantido sob agitação a 37°C por períodos de trinta minutos ou até completa dissociação do tecido cardíaco. Após cada período de incubação o sobrenadante foi recuperado e acrescido de 1mL de FBS. Esta suspensão de células foi submetida à centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente e o precipitado obtido de cada etapa foi ressuscitado em DMEM acrescido de 15% de FBS e posteriormente transferido para garrafa de 75cm² mantida em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por DMEM suplementado com 15% de FBS.

Para fibroblastos de músculos esqueléticos, o tecido seccionado foi transferido para uma garrafa de cultura de 25 cm² contendo 0,2% de colagenase tipo 2 e mantido 37°C por período de 45 minutos, seguido de uma incubação de 0,1% de tripsina por 45 minutos em 37°C. O tecido então foi triturado vigorosamente e passado por um filtro de 70 µm, e as células coletadas foram centrifugadas e plaqueadas em DMEM suplementado com 15% de FBS por 1 hora a 37°C. Após 1 hora o meio de cultura foi trocado e as células aderidas foram mantidas em cultura.

3.4. Cultura primária de mioblastos de músculos esqueléticos de ratos adultos.

Para a obtenção da cultura primária de mioblastos foram utilizados ratos isogênicos Lewis adultos, que foram anestesiados com solução de pentobarbital e retirados os músculos extensores laterais da coxa (ELC), que foram colocados em tubos cônicos contendo HBSS estéril. Sob o fluxo laminar, foi feita uma dissecação mais fina, excluindo todos os tecidos não musculares e incubados os músculos com colagenase 200U/mL, diluída em DMEM (sem soro), em placa de Petri a 37°C por 1 hora. Logo após, as fibras foram dissociadas mecanicamente, e as amostras lavadas com HBSS, centrifugadas e ressuspensas em DMEM 15% FBS. Após 2 ou 3 dias, as fibras foram transferidas para tubo cônico e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Após esta etapa, as células foram recultivadas em DMEM 15% FBS. Após seis dias de cultivo o meio de cultura foi trocado para DMEM 10:2 ou 5:1 (FBS).

3.5. Infecção celular.

Fibroblastos cardíacos ou esqueléticos e mioblastos esqueléticos mantidos em cultura, em garrafas de 150mm², sob confluência de 80-90% foram infectados com

solução estoque de vírus (AdRSVVEGFP ou AdCMVNull ou AdCMVLacZ ou AdCMVIGF-1EGFP). O procedimento de infecção celular foi realizado a partir da substituição do meio de cultura das células por 2,5mL de solução estoque de vírus (DMEM + partículas virais) e mantidos por 12 horas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

3.6. Fluorescência.

As culturas primárias de fibroblastos cardíacos e esqueléticos e mioblastos cultivadas em garrafas de 75cm² e infectadas com AdRSVVEGFP ou AdCMVIGF-1EGFP foram observadas em microscópio de fluorescência (395/470nm).

3.7. *Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).*

Para dosagem de VEGF e IGF-1 foi utilizado o método *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) de captura (R&D System, Inc., Minneapolis, USA). Este ensaio foi realizado em amostras de meio de cultura proveniente de fibroblastos cardíacos transduzidos ou não com AdCMVVEGFP e AdCMVIGF-1EGFP. Placas com 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo monoclonal anti-human VEGF e IGF-1 e incubadas por 18 horas à 4°C.

Posteriormente, a placa foi bloqueada, para evitar ligações inespecíficas com 300 μL de solução de bloqueio (BSA 2%) e incubada por 2 horas à 37°C. Após o bloqueio, foram adicionados 100 μL por poço das amostras e dos padrões diluídos previamente em PBS. Em dois poços foram colocados somente PBS para caracterização do branco. A placa foi incubada por 18 horas à 4°C.

Após incubação, foram adicionados 100 μL do anticorpo conjugado (Anticorpo anti-human Biotinilado) na concentração estabelecida e o material incubado por 3 horas à 37°C. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de Streptoavidina HRP (1:250) por poço e incubado por 30 minutos à 37°C. A cada etapa a placa foi lavada com tampão de lavagem (PBS + Tween 20) por 6 vezes.

A revelação foi realizada através da adição de 100 μL /poço de solução de H_2O_2 e tetrametilbenzidina, incubando-se de 5 a 60 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 30% por poço sob agitação lenta. A leitura foi feita em leitor de ELISA (Power Wave, Bio-tek) utilizando filtro de 450 nm.

3.8. Ensaio de imunofluorescência para detecção das proteínas hVEGF e hIGF-1 em fibroblastos cardíacos modificados com os respectivos vetores virais.

Para a detecção de das proteínas hVEGF e hIGF-1 em fibroblastos cardíacos em cultura foram utilizadas as referidas células na primeira passagem e plaqueadas sob confluência de 70% sob lamínulas de vidro previamente gelatinizadas.

Numa segunda etapa, as lamínulas foram lavadas com tampão PBS (0,1M pH 4,0) por três vezes consecutivas e fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram lavadas novamente com tampão PBS (0,1M pH 4,0) por três vezes consecutivas. Aí então, as células foram permeabilizadas em PBS NP-40 (Nonidett-40 - SIGMA) a 0.1% por 30 minutos a 37°C, e lavadas novamente com tampão PBS (0,1M pH 4,0) por três vezes consecutivas.

Após esta etapa, foi adicionado sobre as lamínulas um volume de 200µL de PBS + BSA 1% (Bovine Seric Bovine-SIGMA) e assim mantidos por 30 minutos a 37°C. A solução foi aspirada e as lamínulas incubadas com o anticorpo primário anti-human VEGF ou anti-human IGF-1(ambos R&D) na diluição de 1:400, e mantidos por 18 horas em câmara úmida a 4°C.

Após o período de incubação anteriormente descrito, as lamínulas foram lavadas com PBS (0,1M pH 4,0) por 4 vezes e incubadas com o anticorpo secundário CY3 (SIGMA), na diluição de 1:700 por 1 hora. Novamente as lâminas foram lavadas com PBS por 4 vezes e mantidas em solução PBS (0,1M pH 4,0) + DAPI (1%).

As lamínulas foram observadas em microscópio de fluorescência ligado a sistema de digitalização de imagem (Leica Imaging Systems) e as imagens digitalizadas dos corações foram analisadas com uso de um software (ImageQuant - Leica).

3.9. Ensaio Colorimétrico.

Culturas primárias de mioblastos e fibroblastos infectados com AdRSVLacZ foram incubadas por 10 minutos com uma solução de glutaraldeído (10%) e formaldeído (0,2%). A solução utilizada na etapa anterior foi retirada e substituída por uma solução de PBS. Numa segunda etapa, as garrafas, contendo as células, foram incubadas com uma solução contendo: 0,1% Xgal; 5mM $K_4Fe(CN)_6$ de potássio; 2mM de $K_3Fe(CN)_6$ e 2mM $MgCl_2$ ao abrigo da luz e por um período de doze horas. Após este período, as células foram observadas em microscópio óptico. Este mesmo ensaio foi realizado em lâminas contendo amostras de coração de rato submetido ao transplante celular.

3.10. Implante celular.

Fibroblastos cardíacos mantidos em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C infectados com AdRSVVEGFP ou AdCMVNull ou AdCMVIGF-1EGFP, foram “descolados” da matriz através da substituição da solução estoque de vírus por uma solução de tripsina. A suspensão celular obtida foi submetida à centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm em temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensionado em 1mL de DMEM e o número de células foi estimado através do método de exclusão por Tripán

Blue. Aliquotas de 0,1mL de DMEM contendo 1×10^6 células foram destinadas ao implante em corações de rato Lewis (12 semanas de idade). Fibroblastos obtidos de musculatura esquelética e mioblastos esqueléticos foram submetidos ao mesmo protocolo, entretanto o vetor adenoviral utilizado foi o AdRSVLacZ. No grupo controle os animais foram submetidos ao implante do veículo empregado (Figura 4).

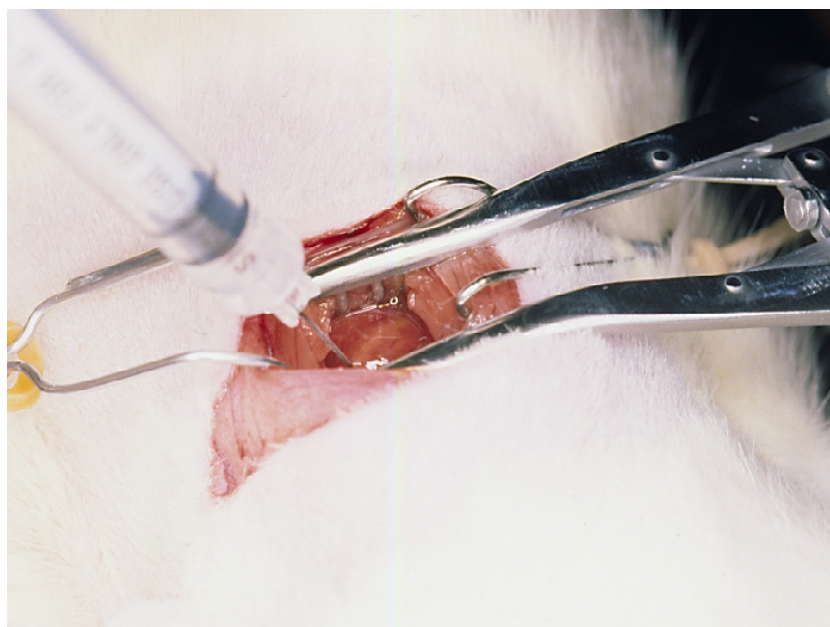


Figura 4: A figura mostra o procedimento cirúrgico no momento da injeção de veículo ou do implante celular.

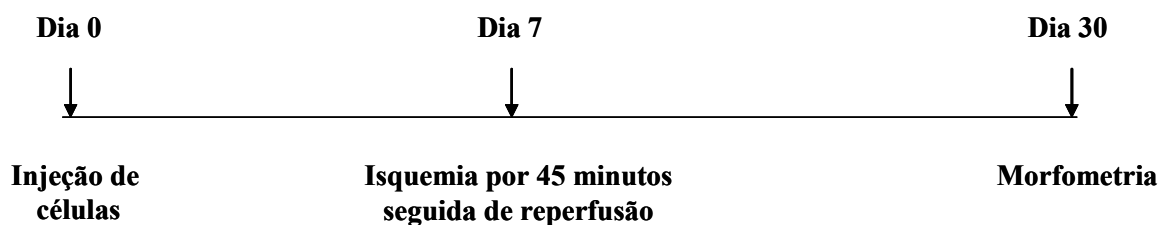
3.11. Dosagem da atividade da enzima β -galactosidase.

Amostras obtidas de corações submetidos ou não ao implante celular foram homogeneizadas com tampão de lise. O homogenato foi submetido à centrifugação por 5 minutos a 200g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos tipo “eppendorf”, devidamente identificados. Em tubos apropriados foram transferidos 5 μ L de cada amostra obtida na etapa anterior, e 200 μ L de galacton -pH 8,3 - incubando-se esta solução por 45 minutos. Ao final do período de incubação, foram adicionados 300 μ L de solução contendo “Green Chemiluminescence amplifier” e em seguida realizou-se a leitura da emissão de luz de cada amostra (Analytical Luminescence Laboratory Monolight 2010, USA).

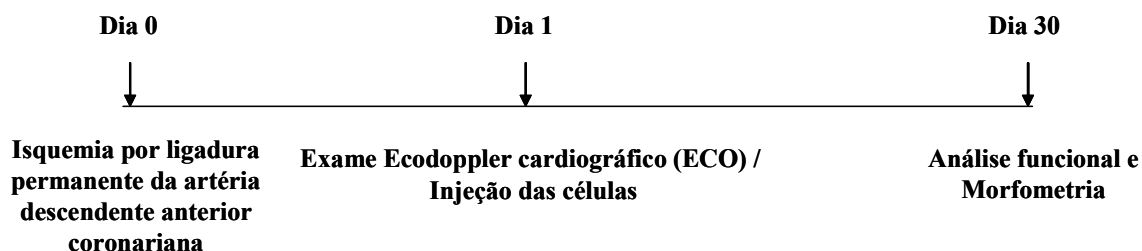
Os valores obtidos foram normalizados pelo peso da amostra.

Foram realizados 2 estudos: O primeiro denominado Experimento 1 (“Proof of Principle”) – Teste de fisibilidade e o segundo denominado Experimento 2 – Teste de eficácia terapêutica.

Serão apresentados a seguir:

Experimento 1 (“Proof of Principle”) – Teste de fisibilidade***Grupos experimentais 1:***

- Grupo controle: injeção de veículo (Veículo).
- Grupo com implante de fibroblastos cardíacos (Célula).
- Grupo com implante de fibroblastos cardíacos transfectados com AdCMVNull (Null).
- Grupo com implante de fibroblastos cardíacos transfectados com AdRSVVEGFP (VEGF).

Experimento 2 – Teste de eficácia terapêutica

Grupos experimentais 2:

- Grupo controle: injeção de veículo (Veículo).
- Grupo com implante do polímero de fibrina (Cola)
- Grupo com implante de fibroblastos cardíacos transfectados com AdCMVNull (Null) ressuspensas em polímero de fibrina .
- Grupo com implante de fibroblastos cardíacos transfectados com AdCMVIGF-1EGFP (IGF-1) ressuspensas em polímero de fibrina .
- Grupo com implante de fibroblastos cardíacos transfectados com AdRSVVEGFP (VEGF) ressuspensas em polímero de fibrina .
- Grupo com implante de fibroblastos cardíacos transfectados com AdRSVVEGFP e AdCMVIGF-1EGFP (IGF-1+VEGF) ressuspensas em polímero de fibrina .

**3.12. Lesão miocárdica por isquemia seguida de reperfusão – Experimento 1
(“Proof of Principle”) – Teste de fisibilidade.**

Sete dias após o implante de 1×10^6 de fibroblastos cardíacos transduzidos ou não com AdRSVVEGFP, AdCMVNull ou AdCMVIGF-1EGFP, os animais foram submetidos à anestesia com uma solução de Ketalar® (80mg/Kg) + Rompun® (12mg/Kg) por via intraperitoneal e submetidos novamente à respiração artificial. A ventilação foi mantida constante em uma frequência de 70mL/min e volume de 2,5mL. Em seguida, os animais foram submetidos à toracotomia esquerda no terceiro espaço intercostal, a artéria coronária foi identificada e ligada por um período de 45 minutos,

processo que leva à lesão miocárdica. Após este período, a ligadura foi desfeita, e foi dado início a reperfusão. A incisão no tórax foi fechada e o ar do espaço pleural removido.

3.13. Lesão miocárdica por Ligadura permanente - Experimento 2 – Teste de eficácia terapêutica.

Os animais foram submetidos à anestesia com uma solução de Ketalar® (80mg/Kg) + Rompun® (12mg/Kg) por via intraperitoneal e submetidos à respiração artificial. A ventilação foi mantida constante em uma frequência de 70mL/min e volume de 2,5mL. Em seguida, os animais foram submetidos à toracotomia esquerda no terceiro espaço intercostal, a artéria coronária foi identificada e ligada processo que leva à lesão miocárdica. A incisão no tórax foi fechada e o ar do espaço pleural removido.

3.14. Estudo morfológico por ecocardiograma.

O ecocardiograma (ECO) foi utilizado no Experimento 2 – Teste de eficácia terapêutica para estimativa do tamanho do infarto do miocárdio (IM), nas primeiras 24 horas pós-lesão – como critério de inclusão, onde animais com IM entre 20-40% de área acinética ou hipocinética entraram para o estudo, e também para análises de morfologia

cardíaca 30 dias pós-implante celular. Após anestesia e tricotomia da face anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e três eletrodos colocados nas patas para obtenção do traçado eletrocardiográfico simultâneo à imagem ecocardiográfica.

O exame foi realizado segundo técnica também já consolidada (Moises et al.,2000; Bonilha et al.,2005), com aparelho SONUS 5500[®], que permite obtenção de imagens cardíacas em tempo real nos modos mono e bidimensional, além da velocidade de fluxo por efeito doppler espectral, com profundidade de 3,0 cm e transdutor de 12 Mhz. As imagens em cortes transversais do ventrículo esquerdo foram gravadas em fitas de vídeo para posterior análise.

Foram utilizadas as janelas paraesternal esquerda (corte longitudinal e transversal) e apical (quatro câmaras e duas câmaras). Foram realizadas as seguintes medidas de análise pelo modo-M: diâmetros do VE ao final da diástole (DDVE) e ao final da sístole (DSVE). O tamanho do infarto (TI) foi avaliado pela medida do comprimento das regiões acinética e/ou hipocinéticas (RAH) das paredes ventriculares, e expresso como percentagem do perímetro total do contorno endocárdico (PE) em três cortes transversais do VE (nível das bordas das cúspides da valva mitral, dos músculos papilares e da região apical). Este método foi previamente validado Moises et al. (2000) utilizando a fórmula:

$$TI = (RAH / PE) 100$$

3.15. Estudo hemodinâmico da função cardíaca.

Após avaliação ecocardiográfica (*Experimento 2 – Teste de eficácia terapêutica*), foram realizados os estudos hemodinâmicos com os animais aquecidos ($\pm 37^{\circ}$ C), mantidos sob plano anestésico adequado com uretana (1,2g/Kg, *iv*, Sigma, MO, USA), e ventilação mecânica (frequência: 100 movimentos/minuto e volume corrente: 10mL/Kg) enriquecida com oxigênio (0,6 a 0,8 L/min). A veia femoral direita foi cateterizada para manutenção do plano anestésico e administração de fármacos e reposição hidrossalina. Um micromanômetro Millar (MikroTip® 2F, Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA) teve sua extremidade distal posicionada dentro da cavidade ventricular esquerda a partir de cateterismo da carótida comum direita para medida da pressão intraventricular. Após toracotomia direita (3^o espaço intercostal) e cuidadosa dissecação da aorta ascendente, foi posicionado um sensor de fluxo (Transonic Flowprobe, Transonic Systems Inc. NY, USA), devidamente conectado ao sistema de interface para amplificação da medida do fluxo na aorta (Small Animal Blood Flow Meter – T206, Transonic Systems Inc. NY, USA).

Os dados obtidos por um software AcqKnowledge® 3.7.5. (Biopac Systems Inc., CA, USA) de pressão intraventricular e fluxo aórtico, possibilitaram computar os valores instantâneos de: pressões ventriculares sistólica (PSVE) e diastólica final (PDFVE em mmHg), frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm), primeira derivada

temporal de pressão positiva e negativa (dP/dt em mmHg/s), débito cardíaco (DC, em mL/min) e volume sistólico ejetado (VSE, em μ L), além de calcular os valores indexados de ejeção pelo peso de cada animal: Índice cardíaco e índice de volume sistólico ejetado (débito cardíaco e volume sistólico ejetado divididos pelo peso do animal em quilogramas, iC e iVSE, respectivamente) e índice do trabalho sistólico (iTS, em gm-m/Kg/batimento), dado pela fórmula:

$$iTS = (PSVE - PDI) \times (iVSE) \times 0,0136$$

A avaliação hemodinâmica dos grupos experimentais foi feita sob condições basais e durante indução de sobrecarga pressórica súbita, com injeção de fenilefrina (25-75 μ g/kg, *i.v. in bolus*, Sigma, St. Louis, MO, USA) suficiente para elevar a pressão sistólica em 50 a 60% da basal. A análise posterior dos dados permitiu correlacionar as diferentes variáveis anteriormente mencionadas, permitindo avaliar a capacidade de ejeção cardíaca em condições basais e de sobrecarga pressórica.

3.16. Avaliação Morfométrica.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (80 mg/kg) e posicionados em decúbito dorsal quando uma incisão cutânea

transversal foi feita estendendo-se do abdome ao tórax do animal. O coração foi exposto e o animal foi perfundido sob pressão constante de 80 – 90 mmHg com solução fisiológica contendo KCl (14mM). Após a constatação da parada cardíaca, a solução fisiológica foi substituída por uma solução de formol tamponado a 4%. O coração foi retirado e mantido por 24 horas em formol tamponado. Após este período, os corações foram seccionados e dispostos em cassetes plásticos do tipo processador/incluser. Os cassetes foram processados em aparelho autotécnico com ciclo total de 12 horas para a desidratação, diafanização e parafinização do material. Os tecidos incluídos em parafina foram cortados em micrótomo (3 μ m de espessura) e dispostos em lâminas. As lâminas foram observadas em microscópio ligado a sistema de digitalização de imagem (Leica Imaging Systems) e as imagens digitalizadas dos corações foram analisadas com uso de um software (ImageQuant - Leica).

3.17. Ensaio imunohistoquímico para detecção das proteínas hVEGF e hIGF-1 em tecidos de corações de rato.

Para a detecção da proteína humana de VEGF em corações de ratos dos diferentes grupos experimentais de ambos os desenhos estudados, foram utilizados cortes histológicos preparados adequadamente em blocos de parafina, onde foi realizado o processo de recuperação antigênica.

A recuperação antigênica foi realizada em lâminas desparafinadas em panela especial para obtenção de vapor com tampão citrato pH 6,0 por 40 minutos. Após este período, as lâminas foram mantidas por 40 minutos em temperatura ambiente.

Numa segunda etapa, as lâminas foram lavadas com tampão PBS (0,1M pH 4,0) por três vezes consecutivas e mantidas em H₂O₂ a 3% por 20 minutos. Em seguida foi adicionado sobre o tecido um volume de 5µL de soro normal e assim mantidos por 30 minutos. O soro foi aspirado e as lâminas incubadas com os anticorpos primários anti-humano VEGF na diluição de 1:200, ou o anti-humano IGF-1 na diluição de 1:200 (Ambos, R&D) e mantidos por 2 horas em câmara úmida.

Após o período de incubação anteriormente descrito, as lâminas foram lavadas com PBS (0,1M pH 4,0) por 2 vezes e depois lavadas com TBST (Tris – HCl 0,05M pH 7,4) e incubadas com o anticorpo secundário universal por 30 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com PBS por 2 vezes e 1 vez com TBST e incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase por 30 minutos e lavadas novamente com PBS por 3 vezes e mantidas em PBS 0,1M pH 7,4.

Finalmente as lâminas foram incubadas com DAB por 5 minutos, lavadas em água corrente e contracoradas com Hematoxilina de Harris sem ácido por 30 segundos, azuladas com água amoniacal, lavadas, desidratadas em álcoois, diafanizadas com Xilol e montadas em Permaunt (Fisher®).

As lâminas foram observadas em microscópio ligado a sistema de digitalização de imagem (Leica Imaging Systems) e as imagens digitalizadas dos corações foram analisadas com uso de um software (ImageQuant - Leica).

3.18. Determinação da densidade capilar.

A densidade capilar no VE dos diferentes grupos experimentais foi quantificada em cortes submetidos à coloração de PAS (ácido periódico de Schiff). Foi realizada a contagem do número absoluto de capilares, contados em campos aleatórios (entre 15 a 25 campos) do espaço determinado para análise, e a densidade foi calculada em função do número de campos analisados e da área de cada campo. A densidade capilar foi representada em número de capilares/mm². O espaço para a análise foi delimitado pelas regiões ântero septal (no sulco interventricular) e parede lateral.

3.19. Ensaio de imunofluorescência para detecção de vasculogênese em tecidos de corações de rato.

Para a detecção de vasculogênese em corações de ratos dos diferentes grupos experimentais foram utilizados cortes histológicos preparados adequadamente em blocos de parafina.

As lâminas foram lavadas com tampão PBS (0,1M pH 4,0) por três vezes consecutivas e em seguida foi adicionado sobre o tecido um volume de 5µL de soro

normal e assim mantidos por 30 minutos. O soro foi aspirado e as lâminas incubadas com o anticorpo primário anti-mouse SMA (anti-mouse smooth muscle actin) (SIGMA) na diluição de 1:400, e mantidos por 18 horas em câmara úmida a 4°C.

Após o período de incubação anteriormente descrito, as lâminas foram lavadas com PBS (0,1M pH 4,0) por 2 vezes e incubadas com o anticorpo secundário CY3 (SIGMA), na diluição de 1:700 por 1 hora. Novamente as lâminas foram lavadas com PBS por 2 vezes e incubadas com um segundo anticorpo primário anti-rabbit VWF (anti-rabbit Von Willebrand factor) (SIGMA) por 18 horas e lavadas novamente com PBS por 3 vezes e mantidas em PBS 0,1M pH 7,4.

Finalmente as lâminas foram incubadas com o segundo anticorpo secundário FITC (SIGMA), na diluição de 1:50 por 1 hora e lavadas novamente com PBS 0,1M pH 7,4 por 3 vezes. Em seguida, as lâminas foram montadas em glicerol Azida 0.1% + DAPI 1%.

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência ligado a sistema de digitalização de imagem (Leica Imaging Systems) e as imagens digitalizadas dos corações foram analisadas com uso de um software (ImageQuant - Leica).

3.20. Determinação da área do infarto e da área de colágeno.

A área do infarto nos diferentes grupos experimentais foi calculada em cortes submetidos à coloração de *tricroômio de masson* (azul) ou à coloração de *picrossírius red* (vermelho vibrante) e definida como porcentagem do ventrículo esquerdo positivo para

marcação de colágeno (em ambas as colorações), indicando a presença e a extensão de zona cicatricial em relação à área total do ventrículo esquerdo (exemplo de medida pela coloração de tricômio de masson azul, Figura 5).

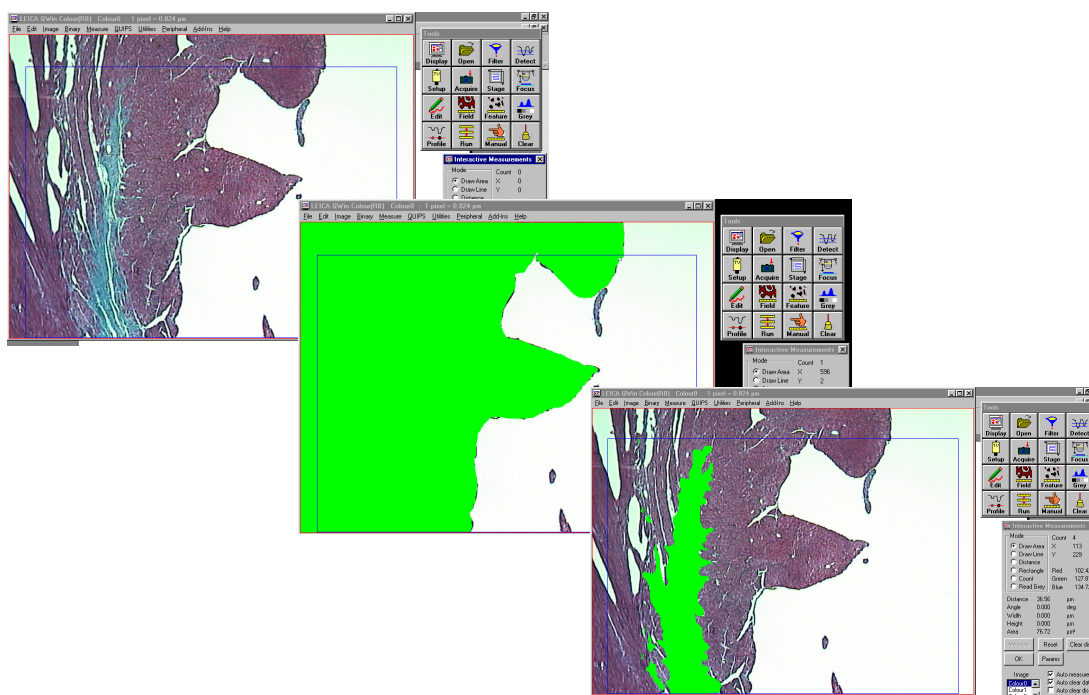


Figura 5: Pode-se observar a marcação em roxo da área normoperfundida, e em azul a marcação de zona positiva para colágeno (coloração por masson azul). No segundo quadro está a quantificação da área total e no terceiro, da área de infarto.

3.21. Extração de RNA.

Para isolar o RNA total de ventrículo esquerdo e direito, as amostras pesando entre 0,2 e 0,5 g foram homogeneizadas em Trizol[®] Reagent. A partir desta etapa, segue-se o protocolo de extração de RNA, conforme instruções do fabricante. O RNA total

extraído foi tratado com 10 U de deoxiribonuclease ribonuclease (RNase)-free por 1 hora a 37°C. Após o tratamento, foi realizado uma extração com igual volume de mistura contendo fenol-clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, seguida por precipitação com 0,2 M de acetato de sódio e 2 volumes de etanol absoluto. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com DEPC. A concentração das amostras de RNA total foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm. A integridade das amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 45 minutos. O Trizol[®] Reagent, uma solução monofásica de fenol e guanidina isotilcianato corresponde a uma variação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987).

3.22. Transcrição Reversa (RT).

Para a síntese do cDNA foram utilizados 5 µg de RNA total, extraído de amostras de ventrículo esquerdo e direito de animais submetidos ao implante de fibroblastos cardíacos transfectados ou não com AdCMVVEGFP – ***Experimento 1 (“Proof of Principle”)- teste de fisibilidade.*** As amostras foram incubadas com 0,5 µg/mL de oligo dT₁₂₋₁₈ a 65°C por 5 minutos, para se obter a primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20 µL contendo 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 1X tampão da enzima, 3U de RNAsin e 2,5U de transcriptase

reversa (AMV-RT). Após incubação por 1 hora a 37°C, a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo para denaturação de híbridos RNA-cDNA formados e inativação da enzima utilizada na reação. Em alguns tubos, a transcriptase reversa não foi adicionada, a fim de se controlar a contaminação ou amplificação de DNA genômico. O cDNA obtido foi estocado a -20°C até que seja realizada a reação de PCR.

3.23. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

O cDNA, obtido na etapa anterior, foi utilizado como molde nas reações de PCR. Para estes experimentos, foram sintetizados *primers* específicos para o gene do VEGF. Para evitar a amplificação inespecífica, os *primers* sintetizados são posicionados em diferentes exons. Desta forma, é possível distinguir, por tamanho, os produtos de PCR derivados da amplificação do cDNA dos derivados da contaminação de DNA genômico.

A tabela 2 mostra a seqüência e o tamanho dos produtos de amplificação, obtidos a partir da reação de RT-PCR.

TABELA 2: *Primers* utilizados nas reações de RT-PCR. Os tamanhos esperados dos produtos de amplificação (pb) são dados com base na seqüência de cDNA do gene.

Molécula	Seqüência do <i>Primer</i>	pb
VEGF 165 <i>Primer 1</i> <i>Primer 2</i>	5'CCC TgA TgA gAT CgA gTA CAT CTT 3' 5' AgC AAg gCC CAC Agg gAT TT 3'	245
18S <i>Primer 1</i> <i>Primer 2</i>	5'gTA ACC CgT TgA ACC CCA TT 3' 5' CCA TCC AAT Cgg TAg TAg Cg3'	136

Após a reação de PCR, 10 µL de cada amostra, correspondente às amostras de ventrículo esquerdo e direito, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%. Os produtos de amplificação foram identificados de acordo com o peso molecular.

Após a transcrição reversa, 1 µL do cDNA foi utilizado nas reações de PCR contendo os pares de *primers*. Para a amplificação do VEGF, foram utilizados 25 pmoles do *primer*, 1,25 mM de dNTP, 50mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-Cl (pH 9,0), 0.1% de Triton X-100 e 2,5 U de Taq DNA Polimerase, em um volume total de 50 µL de reação. Para a amplificação do 18S foram utilizados as mesmas condições experimentais descritas anteriormente, a exceção dos pares de *primers* adequados. O programa utilizado consiste na denaturação das fitas de DNA, anelamento dos *primers* e extensão das cadeias pela DNA polimerase. Todas as etapas de amplificação possuíram duração de 1 minuto, sendo o último ciclo seguido por uma nova extensão a 72°C por 10 minutos (Tabela 3).

TABELA 3: Temperaturas de denaturação, anelamento, extensão e número de ciclos utilizados nas reações de PCR.

	Denaturação	Anelamento	Extensão	nºciclos
VEGF	94 °C	60°C	72°C	38°C
18S	94 °C	60°C	72°C	38°C

Para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos para cada reação. Nestes tubos, foi adicionado somente o “Mix” da reação ao invés de cDNA.

Após a reação de PCR, 10 µL de cada amostra, correspondente às amostras de ventrículo esquerdo e direito, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%. Os produtos de amplificação foram identificados de acordo com o peso molecular.

3.24. Polímero de fibrina autólogo - Autologous fibrin polymer (fibrin sealant) – utilizado no Experimento 2 – Teste de eficácia terapêutica.

Para o preparo do polímero de fibrina, foi separado plasma de 50 mL de sangue total de ratos Lewis isogênicos em frascos contendo 3.8% de citrato de sódio e aí então, dois métodos pra isolar um volume final de 2mL de fibrinogênio foram utilizados: a precipitação por glicina ou a crioprecipitação.

Foi utilizada a trombina humana (BaxterHealthcare, Inc.) como um reagente catalítico para a polimerização da fibrina e foram comparadas as seguintes concentrações:

500 U/mL ou 250 U/mL ou 125 U/mL para aquisição do tempo de polimerização adequado.

Ambas as técnicas de isolamento de fibrinogênio mostraram-se com resultados similares, realizando uma espécie de colóide após a adição de trombina.

Foram preparadas alíquotas de 80µL de solução de fibrinogênio onde 1×10^6 fibroblastos cardíacos foram ressuspensos e depois foram adicionados 20 µl (250 U/ml) de trombina à seringa que já continha 80 µl de fibrinogênio mais a solução de células e foi adequado um tempo de 20'' para que essa solução fosse injetada no miocárdio e a polimerização de fibrina pudesse acontecer.

Viabilidade celular

A fim de determinar se os fibroblastos cardíacos eram capazes de sobreviver na solução de fibrinogênio, foi testada a viabilidade celular usando o Método de Exclusão por Trypan Blue em alíquotas de fibrinogênio com células e comparada o mesmo número de células diluídas em solução com DMEN HIGHT GLUCOSE + 15% FBS após 4 horas.

O mesmo procedimento foi utilizado para testar a viabilidade celular na solução de trombina (500 e 250 U/ml). 160 µl de fibrinogênio com 1×10^6 células foram adicionados à 40 µl de trombina 250 U/ml e plaqueadas em duplicata em placas de 24 poços (24 wells). Após poucos segundos, o polímero com a solução de células se formava em cada poço. Então a solução era completada com 800 µl de DMEN HIGHT GLUCOSE + 15% FBS.

Após 24 horas, foi utilizado um ativador de plasminogênio tecido recombinante (Alteplase, Genentech, Inc.) na concentração de 1 mg/ml para lisar o polímero de fibrina

e aí então foi verificada a viabilidade celular. As amostras foram comparadas com as outras mantidas somente com DMEN HIGHT GLUCOSE + 15% FBS, e foram obtidas viabilidades semelhantes de 90% de células vivas.

3.25. Procedência de sais, reagentes e equipamentos.

Vetores

Clontech Inc. CA, EUA:

- Ponte pShuttle, pIRES2-EGFP e pAdeno-X

Enzimas

Worthington

- Colagenase tipo II

Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil:

- Tripsina (ATV)

Anticorpos

R&D

- monoclonal anti-human VEGF.
- monoclonal anti-human IGF-1

SIGMA

- monoclonal anti-mouse alfa-actina de músculo liso

- monoclonal anti-rabbit Fator de Von Willebrand
- monoclonal anti-mouse CY3
- Monoclonal anti-rabbit FITC

Reagentes

Gibco BRL Grand Island, NY, EUA:

Os reagentes X-Gal (3-indolyl β -O-galactopyranoside), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), F 12, soro fetal bovino (FBS), agarose, trizol, "kit Concert Rapid PCR Purification System".

Merck Darmstadt, Alemanha:

- NaCl, CaCl₂, MgCl₂, KCl, NaH₂PO₄, K₄Fe(CN)₆, K₃Fe(CN)₆, álcool isoamilico, etanol, isopropanol, glutaraldeido, formaldeido, metanol e acetona.

Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA:

- Ácido Sulfúrico, ampicina, ágar, brometo de etideo, clorofórmio, Coomassie Blue, EDTA, estreptomicina, gelatina, NaOH, SDS, fenol:clorofórmio:álcool isoamilico (25:24:1), Rnase A, penicilina, HEPES, isopropanol, tetrametilbenzidina e Tween 20, Água tratada com DEPC; F-12 Coon's.

Soluções:

- PBS (1x): Na_2HPO_4 10mM pH7,4; KH_2PO_4 1,8mM; KCl 2,7mM; NaCl 140mM.
- Solução de coloração de Xgal: X-Gal 1mg/mL, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5mM, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5mM e MgCl_2 1mM.
- Solução de coloração Coomassie Blue: Coomassie Blue G 0,05%, etanol 35% e ácidos acéticos glaciais 10%.
- Solução de formol tamponado: Formol 4%, fosfato de sódio monobásico 4g/L, fosfato de sódio dibásico 6,5g/L em água deionizada.
- Solução de lavagem do ELISA: Tween 20 0,1% e gelatina 0,25% em PBS.
- Tampão de lise celular: tris-HCl 10mM, pH 8,0, NaCl 100mM, EDTA 25mM e SDS 0,5%.
- TE: Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1mM.

Material descartável

As garrafas plásticas e as placas para cultura de células, os tubos plásticos e tubos de congelamento foram obtidas da Nunc, Costar ou Cornig. As placas de ELISA da Costar. As ponteiras plásticas utilizadas nas pipetas automáticas foram obtidas da Eppendorf. As lâminas de vidro foram obtidas da Glass Técnica SP, Brasil.

Equipamentos não citados:

- Centrifuga refrigerada da Sorvall modelo RC-2B (Newtown, CT, EUA), rotores SS34 e GS3; microcentrifuga refrigerada Eppendorf, modelo 5402 (Brinkmann Instruments, NY, EUA); vortex Phoenix AP56; espectrofotômetro Hitachi U-2000; incubadora de CO₂ Forma Scientific modelo 3158; sistema de fotoiluminação e análise Eagle Eye II, Stratagen Inc. (La Jolla, CA, EUA); termociclador minicycler MJ. Research Massachusets, EUA); Criostato DAMON IEC division 3398 e microtomo Leica – RM2135. Analytical Luminescence Laboratory Monolight 2010, USA), (Rodent Ventilator-683, Harvard Apparatus, USA).

3.26. Análise Estatística.

Todos os resultados foram expressos em média±EPM. Diferenças estatisticamente significativas foram analisadas pelo teste t de Student não pareado entre duas medidas, e teste ANOVA quando mais de duas variáveis forem consideradas. O grau de significância foi definido com $p < 0,05$.

4 . Resultados

Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).

Para a dosagem de VEGF em fibroblastos cardíacos transduzidos com AdRSVVEGFP foi utilizado o método *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) de captura. A faixa de detecção do teste foi baseada em amostras de concentração conhecida de VEGF (Figura 7).

A dosagem da expressão do VEGF foi realizada no meio de cultura de fibroblastos cardíacos transduzidos com AdRSVVEGFP após 24 horas da transdução.

TABELA 4: A tabela representa a concentração de VEGF em meio de cultura de fibroblastos cardíacos após 24 horas da transdução com AdRSVVEGFP. Cada alíquota representa um experimento. O sobrenadante controle representa meio de cultura de fibroblastos cardíacos mantidos sob as mesmas condições experimentais das células transduzidas, exceto pela ausência dos vetores virais.

Alíquota	Transfectada	Controle
1	> 2098,4 pg/mL	< 31,2 pg/mL
2	> 2098,4 pg/mL	< 31,2 pg/mL
3	> 2098,4 pg/mL	< 31,2 pg/mL

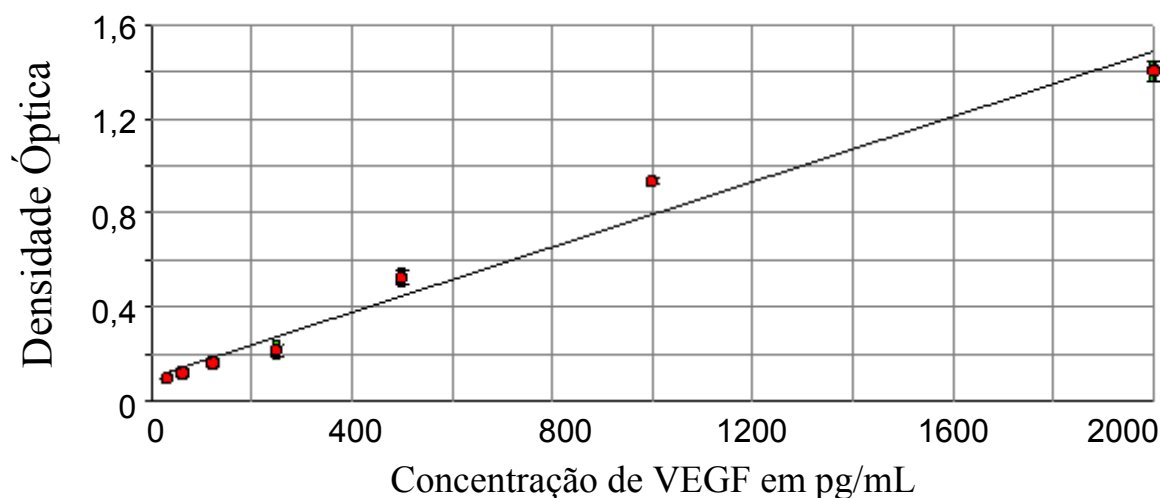


Figura 7: A figura representa curva - padrão de densidade óptica e concentrações conhecidas de VEGF.

A dosagem e detecção da proteína recombinante IGF-1 foi realizada no meio de cultura de fibroblastos cardíacos transduzidos com AdCMVIGF-1 após 24 horas da transdução. Os resultados obtidos estão representados na tabela abaixo (Tabela 5).

TABELA 5: A tabela representa a concentração de IGF-1 em meio de cultura de fibroblastos cardíacos após 24 horas da transdução com AdCMVIGF-1. Cada alíquota representa um experimento. O sobrenadante controle representa meio de cultura de fibroblastos cardíacos mantidos sob as mesmas condições experimentais das células transduzidas, exceto pela ausência dos vetores virais.

Alíquota	Transfectada	Controle
1	> 440,29pg/mL	< 36,76
2	> 440,29pg/mL	< 36,76
3	> 440,29pg/mL	< 36,76

Mioblastos Esqueléticos, Fibroblastos Cardíacos e Esqueléticos.

Para conhecer o comportamento dos fibroblastos de diferentes tecidos para implante cardíaco, foram desenvolvidos experimentos em comparação com o implante de mioblastos esqueléticos, estes, já conhecidos em nosso laboratório (Becker et al., 2006) e na literatura (Menaschè, 2000), considerando a possibilidade de utilizar fibroblastos de tecidos facilmente acessíveis para terapia celular quando pensamos em aplicabilidade clínica. A utilização de fibroblastos oferece potenciais de suporte para fortalecimento da cicatriz de áreas isquêmicas, já que este tipo celular é característico de tecido cicatricial, e/ou de produzir fatores específicos que possam agir no tecido remanescente (Camelliti et al., 2005).

Deve-se levar em conta que, em procedimentos clínicos, estas células seriam obtidas de biópsia interventricular, o que torna o procedimento muito invasivo, com isso, seria interessante observar o comportamento de células de mesma morfologia, porém proveniente de diferentes tecidos, como fibroblastos obtidos da musculatura esquelética.

A expressão do transgene no miocárdio de ratos submetidos ao implante de mioblastos (1×10^6 células) transduzidos com AdRSVLacZ permaneceu até 7 dias após a injeção; entretanto, ao comparar aos valores obtidos para a expressão do transgene quando os ratos foram submetidos ao implante de 1×10^6 de fibroblastos cardíacos transfectados com o mesmo vetor viral, verificaram que a expressão do transgene

persistiu até o quadragésimo quinto dia após o implante (Figura 8). Este fato é interessante ao considerarmos que a diminuição da expressão de um transgene *in vivo* normalmente está vinculada a uma resposta imunológica, desencadeada pelo vetor viral e não deveria variar de um tipo celular para outro.

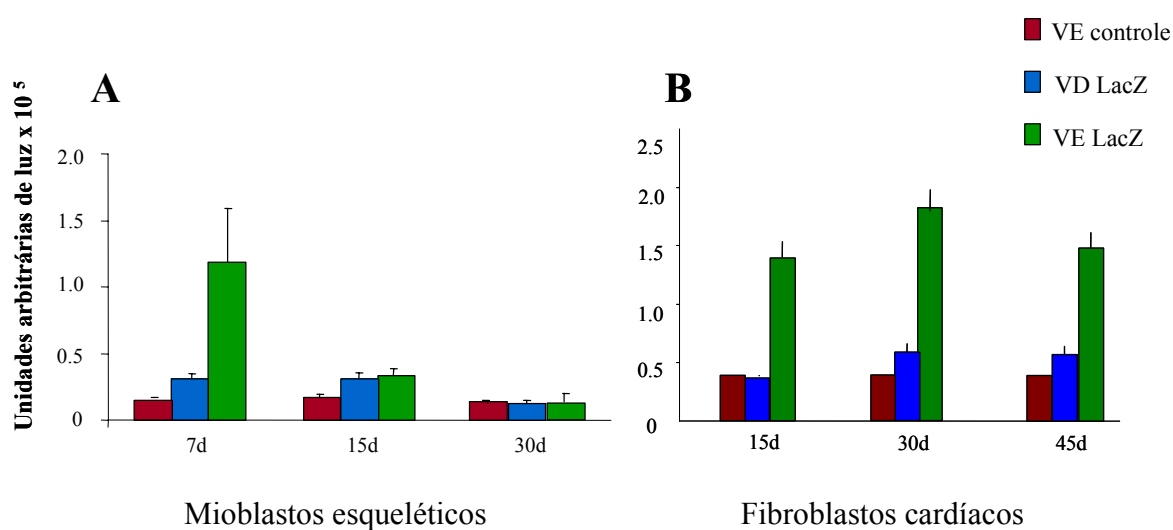


Figura 8: Mioblastos esqueléticos geneticamente modificados para expressar o gene repórter LacZ (AdRSVLacZ) injetados diretamente na parede livre do ventrículo esquerdo (VE), mostram a expressão do transgene por até 7 dias como pode ser observado em (A), enquanto que fibroblastos cardíacos, quando submetidos ao mesmo procedimento apresentaram expressão do transgene por até 45 dias.

A partir destes resultados tornou-se interessante observar a expressão do transgene (LacZ) por mais tempo, e ainda estudar se o implante de fibroblastos obtidos de outro tecido, como por exemplo, do músculo esquelético apresentariam o mesmo tipo de resposta.

Com isso, fibroblastos cardíacos ou provenientes de músculo esquelético foram transduzidos com AdRSVLacZ e implantados em coração de rato, a fim de se determinar a atividade da enzima betagalactosidase no decorrer do tempo. Os animais

foram sacrificados em quatro diferentes intervalos de tempo: 15, 30 e 45 dias pós-implante.

Foram ensaiados três animais para cada ponto e as amostras foram separadas em ventrículo direito e esquerdo e os resultados estão representados nas figuras 9 e 10.

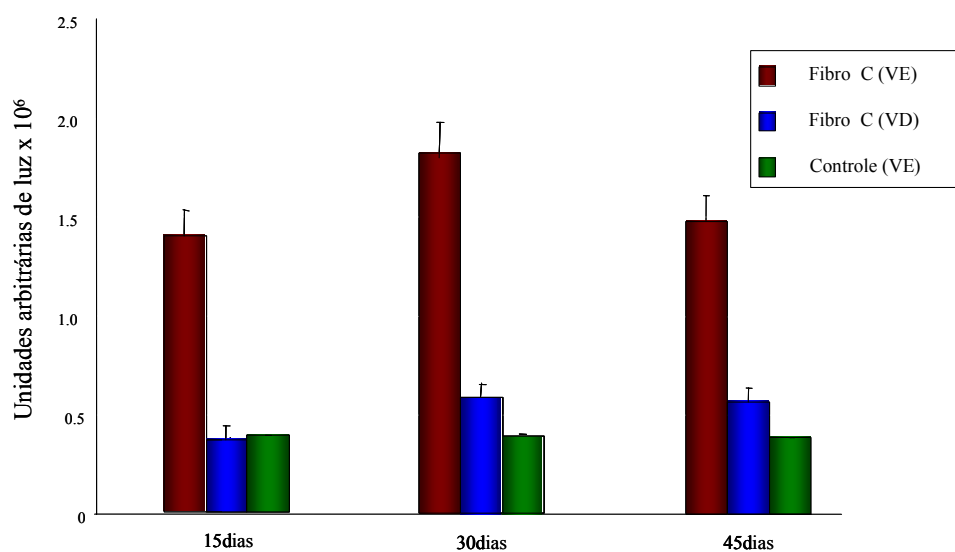


Figura 9: Fibroblastos cardíacos geneticamente modificados para expressar o gene repórter LacZ (AdRSVLacZ) injetados diretamente na parede livre do ventrículo esquerdo (VE), mostram a expressão do transgene por até 45 dias.

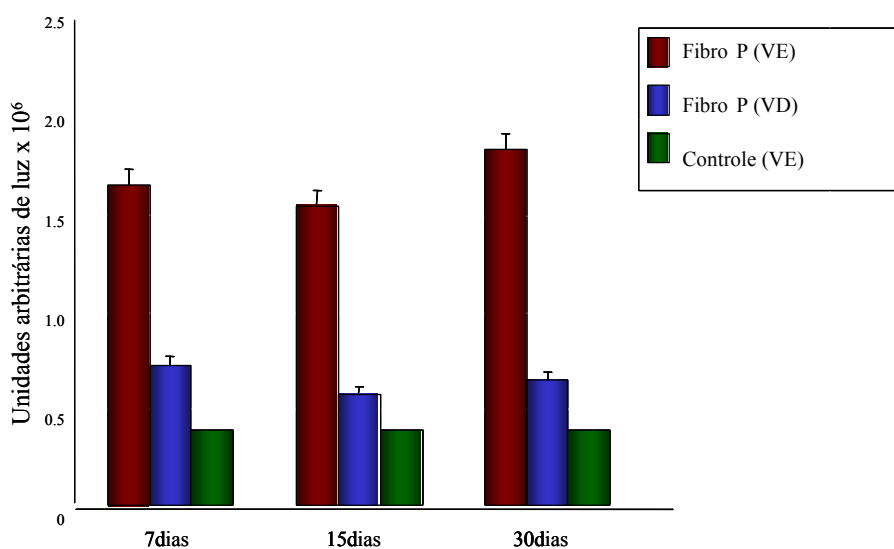


Figura 10: Fibroblastos de musculatura esquelética geneticamente modificados para expressar o gene repórter LacZ (AdRSVLacZ) injetados diretamente na parede livre do ventrículo esquerdo (VE), mostram a expressão do transgene por até 30 dias.

Os resultados das análises da atividade da enzima betagalactosidase, avaliados em amostras de ventrículo esquerdo e ventrículo direito de animais submetidos ao implante celular, nos permitiram concluir que pelo menos até 30 dias não há diferença entre fibroblastos cardíacos e de musculatura esquelética sugerindo que a resposta depende do tipo celular e não do seu local de origem e parece que as células transplantadas permanecem na região do implante, uma vez que não houve atividade da enzima betagalactosidase em ventrículo direito. Porém a cultura de fibroblastos cardíacos tem um rendimento maior quando comparada com a de fibroblastos de músculo esquelético, o que nos fez optar, já que era muito importante o número de

células obtido, embora a biópsia muscular seja muito mais simples do ponto de vista da aplicabilidade clínica.

Experimento 1 (“Proof of Principle”) – Teste de Fisibilidade

O número de animais utilizados neste experimento para os grupos foi VEÍCULO (n=7), CÉLULA (n=5), NULL (n=8) e VEGF (n=12).

Determinação da presença da proteína hVEGF

Com bases nos resultados vistos anteriormente, houve interesse em verificarmos se a proteína humana VEGF estava presente no tecido cardíaco após os 30 dias do implante e 21 dias do evento isquêmico. A análise dos cortes histológicos de coração mostrou que a marcação positiva para VEGF humano é significativamente maior nos animais do grupo VEGF e mais, a presença de células marcadas positivamente não está

distribuída uniformemente no ventrículo esquerdo. Dentro e ao redor da cicatriz foram as regiões onde se observou um maior número de células marcadas positivamente para o VEGF humano (Figuras 11 e 12).

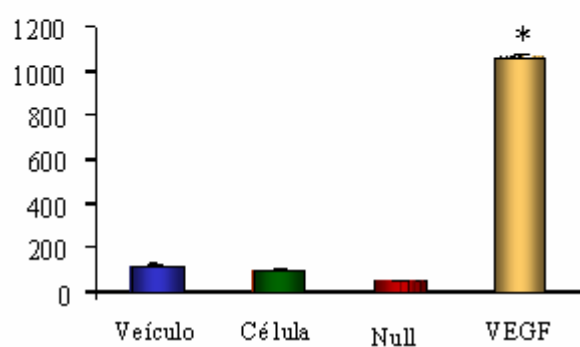


Figura 11: As barras representam a média \pm desvio padrão do número de células com marcação positiva para a proteína VEGF dentro da cicatriz nos 4 grupos estudados. * $p=0,0001$ em relação aos grupos Veículo, Célula e Null.

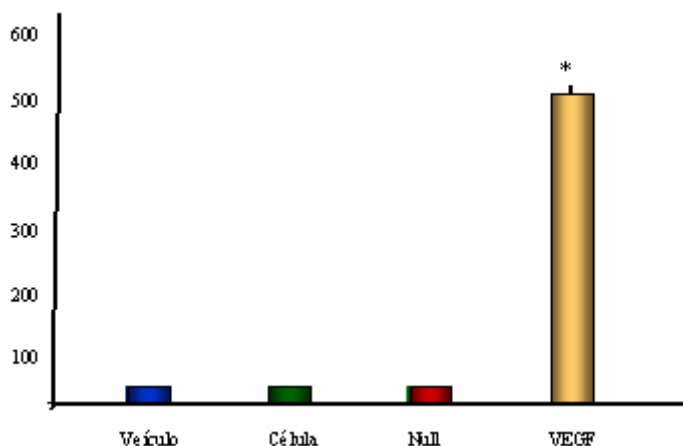


Figura 12: As barras representam a média \pm desvio padrão do número de células com marcação positiva para a proteína VEGF ao redor da cicatriz nos 4 grupos estudados. * $p=0,0001$ em relação a Veículo, Célula e Null.

Expressão local de mRNA VEGF

Os resultados mostraram que a presença do mRNA humano está restrita aos animais avaliados 7 dias após o implante, enquanto que nos outros intervalos de tempo estudados (15 e 30 dias após o implante) não foi possível detectá-lo. Além disso, observamos que a presença do mRNA mensageiro do VEGF humano, detectado por RT-PCR, parece restrito ao ventrículo esquerdo dos animais, uma vez que não houve a sua presença em amostras do ventrículo direito (dados não mostrados).

Os resultados mostraram que somente um dos três animais submetidos ao implante de fibroblastos cardíacos modificados para produzir VEGF apresentaram

expressão evidente do gene hVEGF (245pb) 7 dias após ao evento isquêmico. Dados do laboratório ainda não publicados evidenciaram a presença de apenas 6 a 12% de células da medula óssea marcadas radiativamente e injetadas no músculo cardíaco, sugerindo que há variabilidade na fixação destas células no tecido, esta observação pode explicar em parte, a variabilidade dos animais quando avaliados para detecção da presença do mRNA do hVEGF nos animais do grupo VEGF.

Diante do ensaio de imunohistoquímica que detectou a presença da proteína hVEGF significativamente maior no grupo VEGF em relação aos outros grupos 30 dias após o implante, tornou-se interessante investigar a possibilidade de que o aumento da proteína hVEGF pudesse influenciar a expressão do gene rVEGF e de seus receptores rFLT-1 e rKDR. Para isso, foi necessária a utilização de Real Time PCR para a quantificação da expressão desses genes, utilizando o gene rCiclofilina A como normalizador dos resultados. Os dados obtidos não mostraram diferenças significantes entre a expressão de rVEGF, rFLT-1 e rKDR em amostras dos grupos VEGF (n=3) e NULL (n=3) ($1,04 \pm 0,22$ vs. $0,85 \pm 0,3$; $5,21 \pm 0,08$ vs. $5,15 \pm 0,19$, e $6,61 \pm 0,14$ vs. $6,56 \pm 0,11$; respectivamente, $p > 0,05$).

Determinação da densidade capilar

Considerando que o VEGF está entre os principais genes envolvidos na regulação da angiogênese (Miller, 1990), fez-se necessário à quantificação da densidade

capilar nestes corações. Para tanto, cortes histológicos de coração dos diferentes grupos experimentais foram submetidos à coloração de PAS (ácido periódico de Schiff).

A contagem do número absoluto de capilares foi realizada em campos aleatórios (entre 15 a 25 campos), e a densidade calculada em função do número dos campos analisados e representada em número de capilares/mm². O espaço para a análise foi delimitado pelas regiões ântero septal no sulco interventricular e a parede lateral.

É interessante observar que o aumento de células positivas para a proteína hVEGF no grupo VEGF foi acompanhada de um aumento significativo da densidade capilar, quando comparado aos grupos VEÍCULO, CÉLULA e NULL (VEÍCULO = $245 \pm 2,6$; CÉLULA = $349,2 \pm 0,9$; NULL = 288 ± 19 e VEGF = $543,8 \pm 52,1$; comparado ao grupo VEÍCULO mostrando um efeito protetor do VEGF; $p=0,01^*$) (Figura 13).

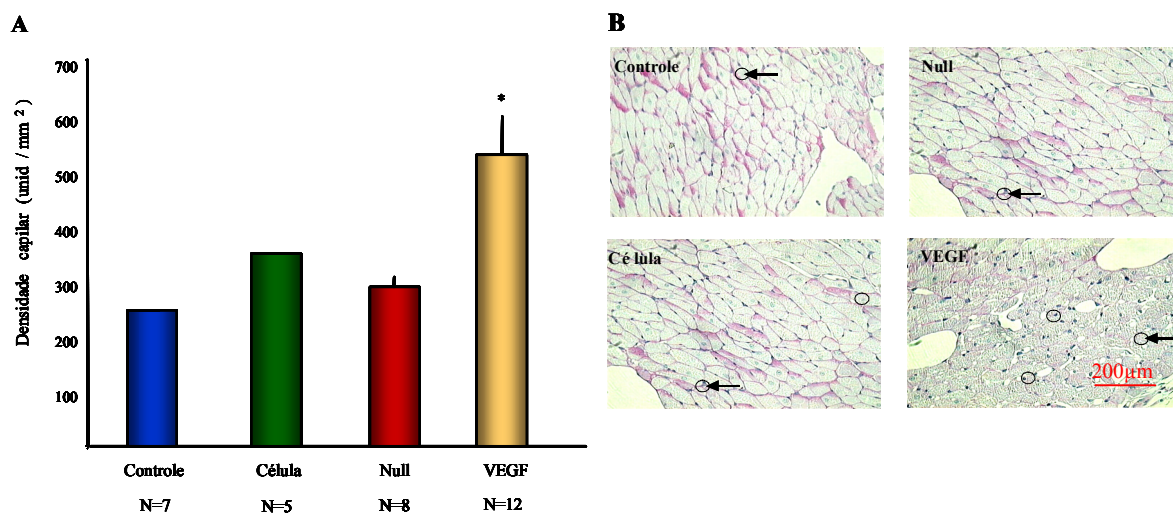


Figura 13: Em (A) as barras representam a média \pm erro padrão da média da densidade capilar / mm². * $p < 0,05$ em relação aos outros grupos estudados. Em (B) está representada a coloração PAS (Reagente de Schiff) nos cortes histológicos dos diferentes grupos.

Detecção de densidade vascular

Através do ensaio de imunofluorescência dupla marcação para Fator de Von Willebrand (marcador de células endoteliais)- (WVF) e Alfa - Actina de músculo liso (marcador de células musculares lisas)- (SMA) em lâminas histológicas de corações dos grupos estudados analisados quatro semanas após o implante, foi observado um aumento significativo na densidade vascular no grupo VEGF (45 ± 3 vasos/campo), quando comparado com os outros grupos: NULL (10 ± 2), CÉLULA (8 ± 1) e VEÍCULO (16 ± 3) (Figura 14A). Foi observado um grande número de vasos no grupo VEGF quando as imagens de WVF e SMA são sobrepostas sugerindo maturação desses vasos recém formados (Figura 14B). É importante ressaltar que não foi observada formação de hemangiomas em nenhum dos grupos tratados.

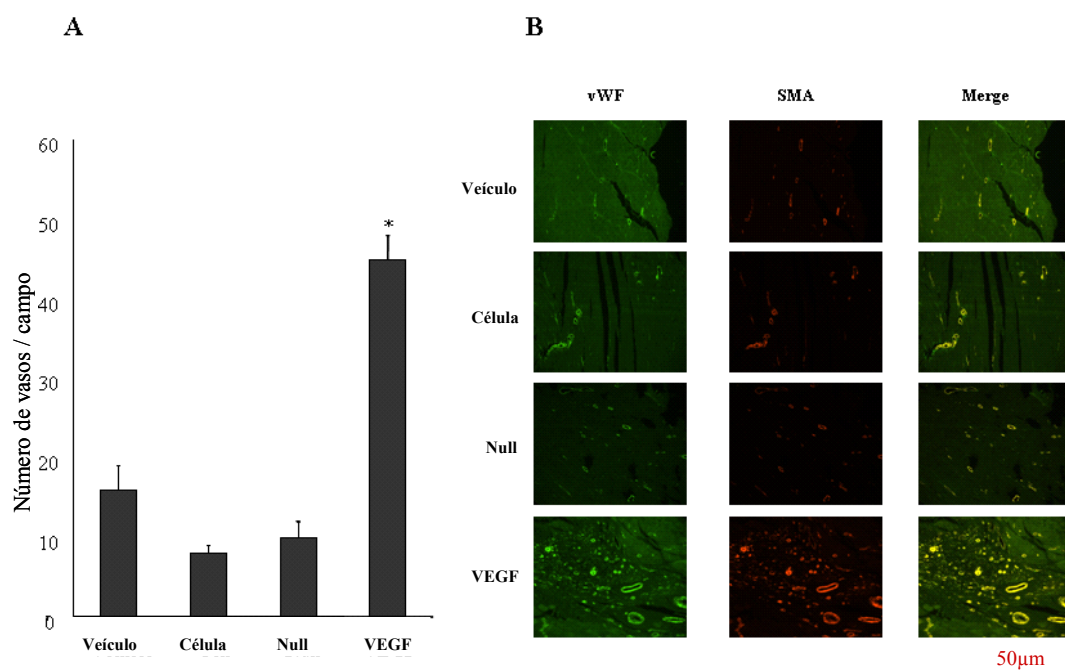


Figura 14: Ensaio de imunofluorescência dupla marcação para detecção de vasculogênese. Observa-se um aumento significativo na densidade vascular no grupo VEGF (45 ± 3 vasos/campo), quando comparado com os outros grupos: NULL (10 ± 2), CÉLULA (8 ± 1) e VEÍCULO (6 ± 3), com ($*p=0,001$) (A). Em (B) observa-se a formação de vasos estruturados através de VWF (verde) para detecção de células endoteliais e SMA (vermelho) para detecção de células musculares lisas.

Determinação da área de infarto.

A área cicatricial dos diferentes grupos foi definida como porcentagem do ventrículo esquerdo positivo para marcação de colágeno (masson azul), indicando a presença e a extensão de zona cicatricial.

A avaliação da relação ventrículo esquerdo / cicatriz foi feita a partir da área total do ventrículo esquerdo (VE) e da área relativa à cicatriz.

Observa-se que a relação VE/cicatriz foi menor no grupo de animais submetidos ao implante celular, onde as células foram previamente transduzidas com AdRSVVEGF (VEGF) ($3,0 \pm 1,3$ %) quando comparada aos grupos VEÍCULO, CÉLULA e NULL ($8,0 \pm 0,8$; $5,5 \pm 0,6$ e $4,0 \pm 1,2$ %, respectivamente, com $*p < 0,05$) (Figura 15).

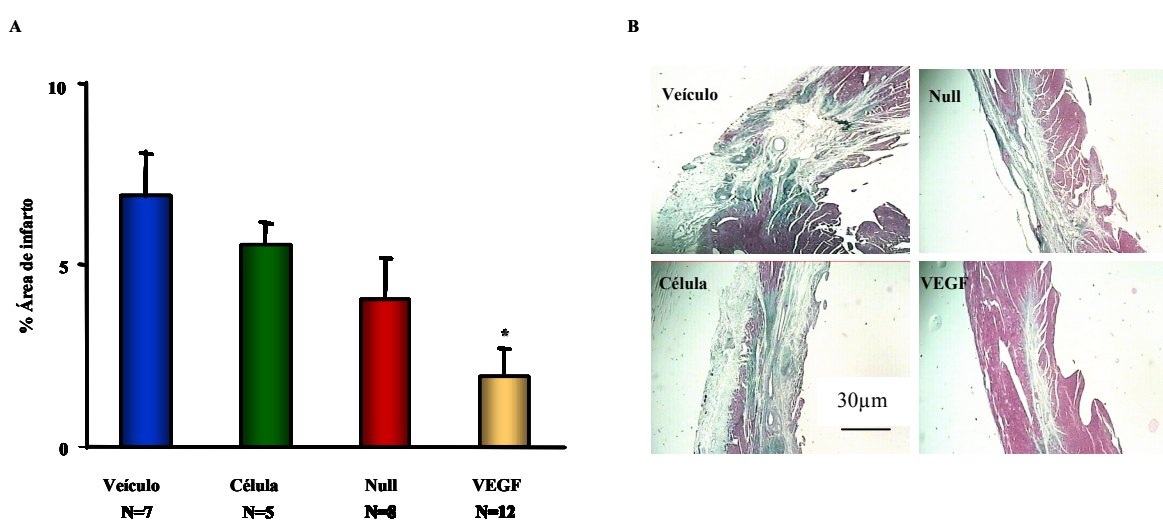


Figura 15: Em (A) as barras representam a média \pm erro padrão da média da relação entre a área total do VE e a área relativa à cicatriz. $*p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo. Em (B) está representada a coloração Tricômio de Masson Azul nos cortes histológicos dos diferentes grupos.

Vale lembrar que a relação VE/cicatriz no grupo VEGF é menor quando comparado ao grupo VEÍCULO mostrando um efeito protetor do VEGF em caso de evento isquêmico, uma vez que este fator promove estímulo na formação de capilares, aumentando as circulações colaterais, limitando assim a progressão e a extensão do infarto.

Experimento 2 – Teste de eficácia terapêutica

Com base nos dados apresentados no **Experimento 1 (“Proof of principle”) – Teste de fisibilidade** e achados recentes de nosso laboratório de que o uso de polímero de fibrina durante o transplante celular é mais eficaz em aumentar a retenção de células no miocárdio, nós nos propusemos a testar o efeito terapêutico do transplante celular considerando a possibilidade de sinergia entre os dois fatores: VEGF e IGF-1, utilizando o polímero de fibrina em um modelo de lesão cardíaca de maior magnitude e que se acompanha de comprometimento funcional, em contraste com a estratégia utilizada até este momento que visava testar a possibilidade de modificar o “*milieu*” cardíaco com a terapia de células modificadas geneticamente em presença de isquemia, mas sem comprometimento de função cardíaca importante.

Os dados obtidos em trabalho ainda não publicado pelo nosso laboratório sugerem uma retenção de células pelo miocárdio em torno de 7% pós-isquemia por 45 minutos seguida de reperfusão quando estas são injetadas diretamente no músculo e ressuspendidas em solução salina, já quando as mesmas células são implantadas nas

mesmas condições, porém ressuspensas em polímero de fibrina, a retenção no miocárdio aumenta para 17% (Figura 16A e 16B).

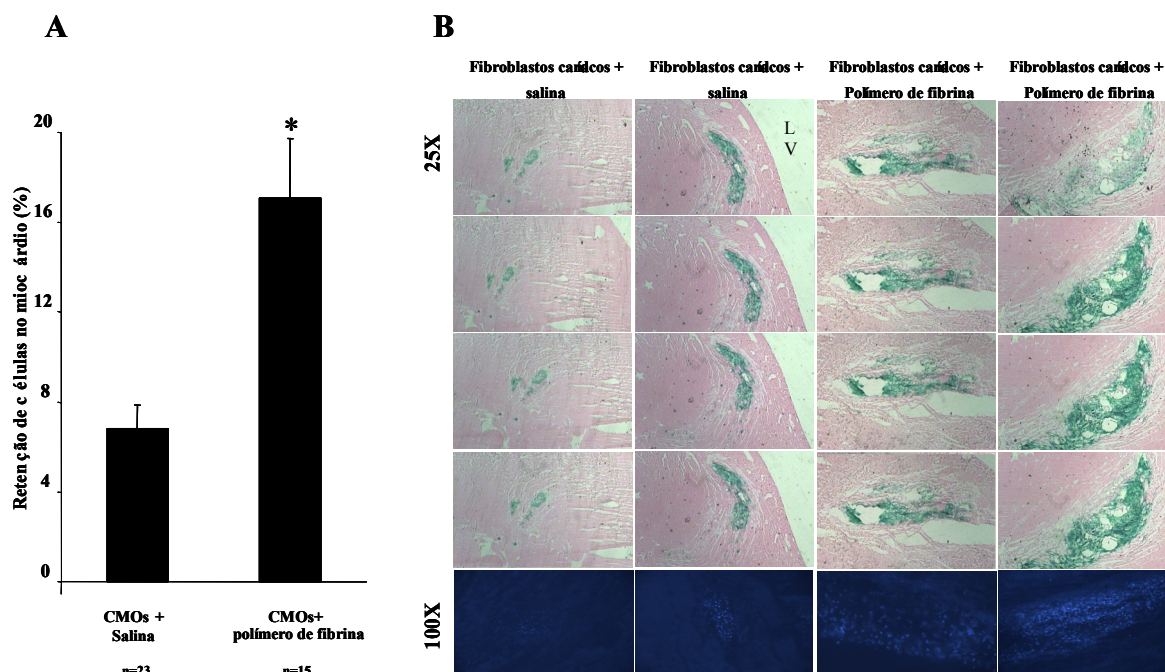


Figura 16: (A) Gráfico representativo da retenção de células da medula óssea (CMOs) marcadas radioativamente e ressuspensas em salina ou polímero de fibrina em animais submetidos à lesão de isquemia seguida de reperfusão por 45 minutos e submetidos ao implante das mesmas após 24 horas da lesão. (B) Nesta sequência de fotos, pode-se observar que fibroblastos cardíacos modificados geneticamente com AdRSVLacZ submetidos ao mesmo procedimento de A apresentam maior atividade da enzima betagalactosidase (verde) no grupo que foi implantado com polímero de fibrina quando comparado ao grupo salina. Observa-se também a marcação de núcleos celulares através de imunofluorescência para detecção do intercalante de DNA (DAPI) (azul).

Com base nestes resultados, no presente estudo testou-se o efeito terapêutico do implante de fibroblastos cardíacos modificados com AdRSVVEGFP e/ou AdCMVIGF-1EGFP associado à tecnologia do polímero de fibrina.

O número de animais utilizados neste estudo para os grupos foi: VEÍCULO (n=6), POLÍMERO (n=6), CÉLULAS (n=6), NULL (n=6), IGF-1 (n=4), VEGF (n=5) e IGF-1+VEGF (n=5).

Reação de imunofluorescência para detecção das proteínas hIGF-1 e hVEGF.

Com o objetivo de detectarmos as proteínas VEGF e IGF-1 nas células transduzidas com os respectivos vetores virais foram realizadas reações de imunofluorescência com os anticorpos específicos anti-hVEGF e anti-hIGF-1 (ambos R&D), conjugados com o anticorpo secundário anti-mouse CY3 (SIGMA) (vermelho), e os núcleos celulares foram marcados com um intercalante de DNA (DAPI) (azul). É interessante observar que os fibroblastos cardíacos infectados com AdRSVVEGFP ou AdCMVIGF-1EGFP apresentam produção da proteína concomitante com a expressão do gene repórter EGFP (verde) (Figura 17).

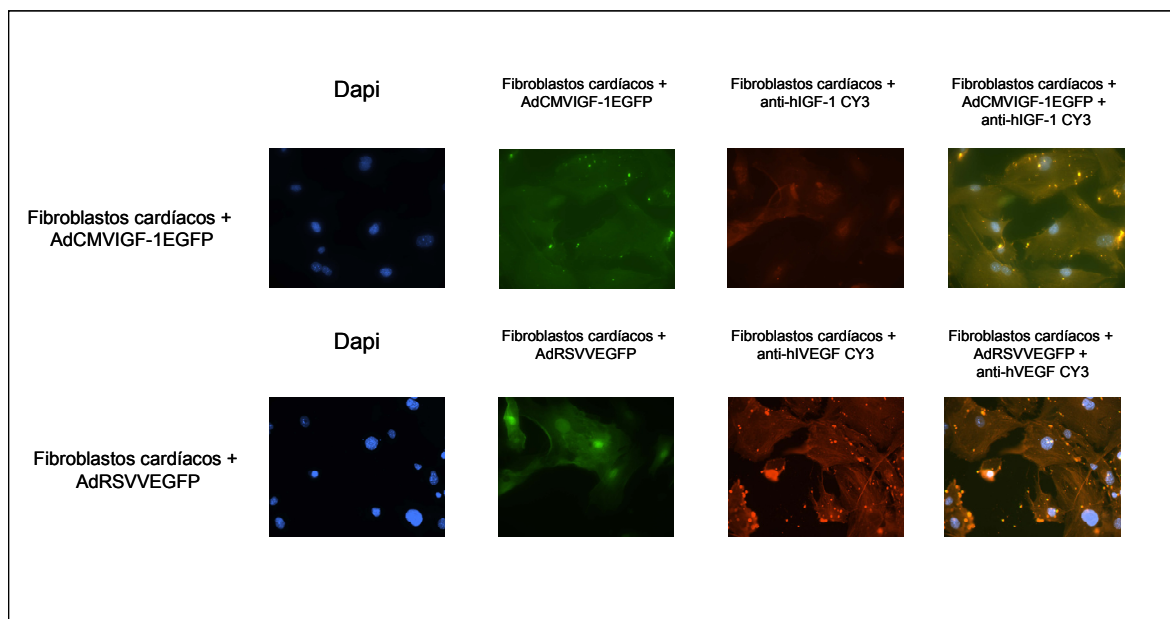


Figura 17: Reação de imunofluorescência para detecção das proteínas hIGF-1 e hVEGF. Em azul, os núcleos celulares foram marcados com DAPI, em verde, as células foram transduzidas com os respectivos vetores virais, em vermelho a reação de imunofluorescência propriamente dita com as células positivas marcadas e na última coluna está representada a colocalização das imagens.

Determinação da presença das proteínas hVEGF e hIGF-1

Com bases nos resultados obtidos até o presente momento, houve a necessidade de verificarmos se as proteínas humanas VEGF e IGF-1 estavam presente no tecido cardíaco após os 30 dias do implante neste novo modelo. A análise dos cortes histológicos de coração mostrou que a marcação positiva para VEGF humano, assim

como para o IGF-1 humano é significativamente maior nos animais do grupo VEGF, IGF-1 e IGF-1+VEGF, respectivamente (Figuras 18 A e B e 19 A e B).

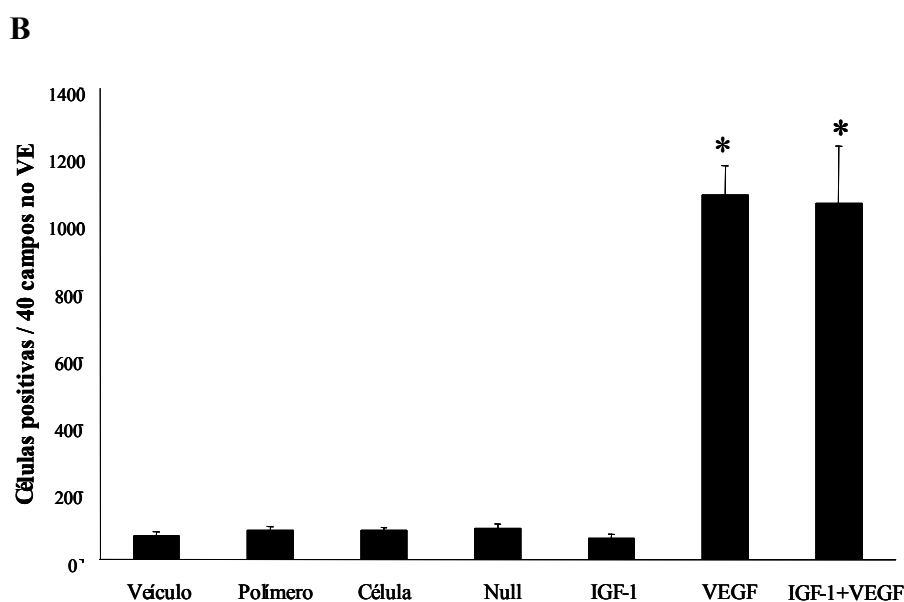
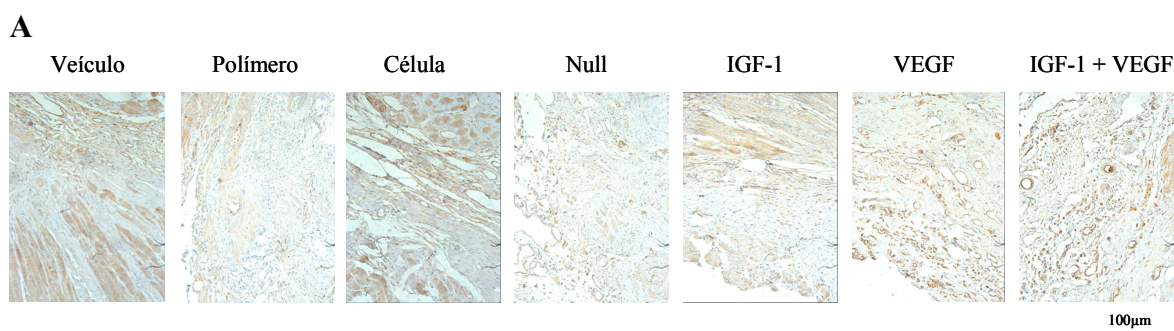


Figura 18: (A) Reação de imunohistoquímica para detecção da proteína hVEGF. Em castanho estão as células positivas para a referida proteína. (B) As barras representam a média \pm desvio padrão do número de células com marcação positiva para a proteína VEGF no ventrículo esquerdo nos 7 grupos estudados. * $p=0,0001$ quando comparados com os grupos Veículo, Polímero, Célula, Null, e IGF-1.

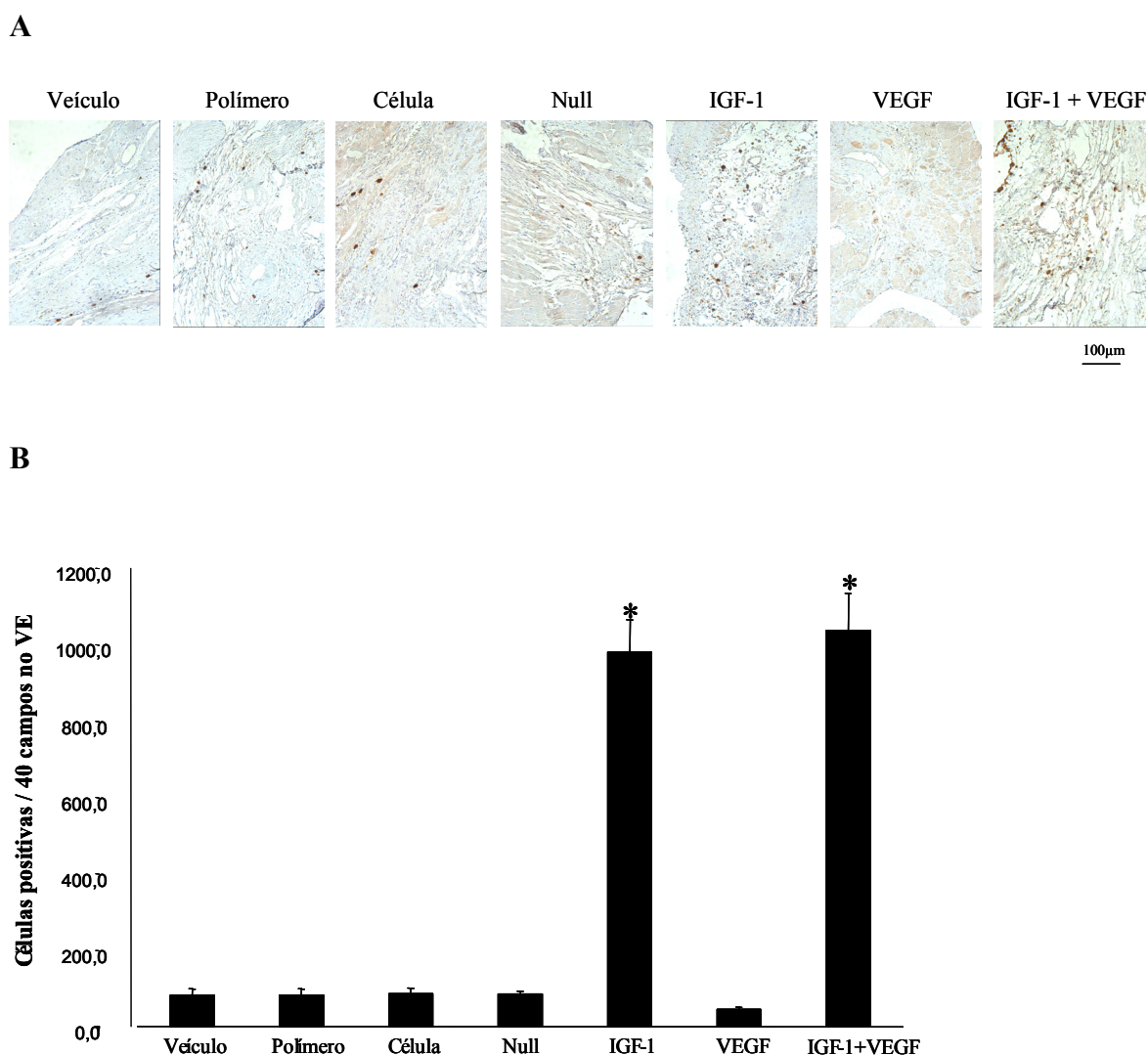


Figura 19: (A) Reação de imunohistoquímica para detecção da proteína hIGF-1. Em castanho estão as células positivas para a referida proteína. (B) As barras representam a média \pm desvio padrão do número de células com marcação positiva para a proteína VEGF no ventrículo esquerdo nos 7 grupos estudados. * $p=0,0001$ quando comparados com os grupos Veículo, Polímero, Célula, Null, e VEGF.

Determinação da densidade capilar

Após a constatação da presença das proteínas VEGF e IGF-1 nos cortes histológicos dos diferentes grupos experimentais, tornou-se importante a quantificação da densidade capilar nesse novo estudo onde há a sinergia de dois fatores: VEGF e IGF-1. Para isso, cortes histológicos de coração dos diferentes grupos experimentais foram submetidos à coloração de PAS (ácido periódico de Schiff).

A contagem do número absoluto de capilares foi realizada da mesma forma como descrito em *Experimento 1*.

É interessante observar que assim como no primeiro estudo, houve um aumento significativo no grupo VEGF em relação aos grupos Veículo, Polímero, Célula, Null e IGF-1, porém, no grupo VEGF + IGF-1 houve um aumento no número de capilares significativamente maior em relação aos grupos, inclusive quando comparado ao grupo VEGF ($153 \pm 21,48$ vs. $158,67 \pm 13,91$ vs. $180,83 \pm 40,83$ vs. $152,67 \pm 28,95$ vs. $186,80 \pm 55,80$ vs. $978 \pm 104^*$ vs. $1342,60 \pm 79,43^*\#$ capilares/mm², *p=0,0001 comparado aos outros grupos, para os grupos Veículo, Polímero, Célula, Null, IGF-1, VEGF, IGF-1+VEGF, respectivamente e #p=0,0001 comparado ao grupo VEGF), sugerindo um efeito sinérgico dos dois fatores (Figura 20).

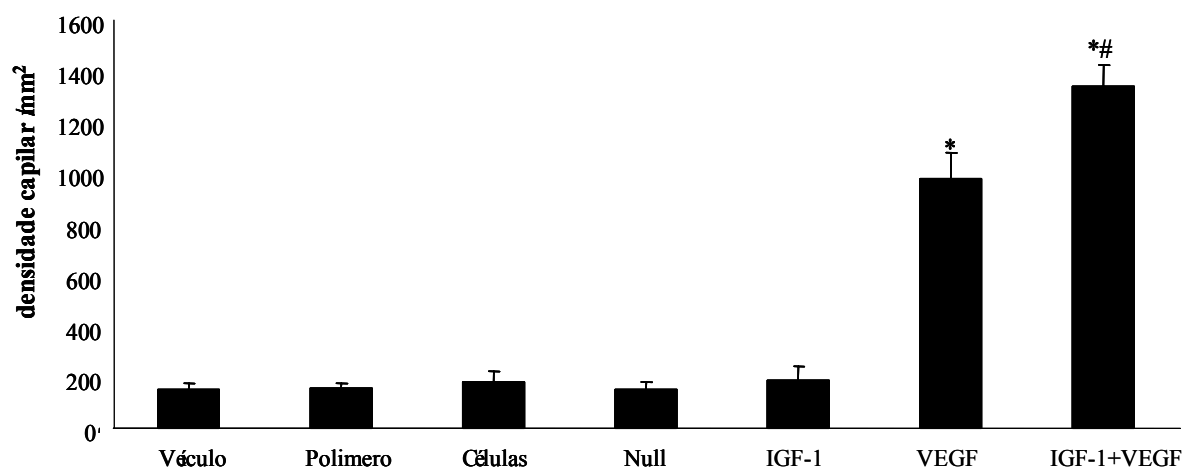


Figura 20: As barras representam a média \pm erro padrão da média da densidade capilar / mm². *p=0,0001 em relação aos outros grupos estudados; #p=0,0001 quando comparado com o grupo VEGF.

Detecção de densidade vascular

Através do ensaio de imunofluorescência dupla marcação para Fator de Von Willebrand (marcador de células endoteliais)- (WVF) e Alfa - Actina de músculo liso (marcador de células musculares lisas)- (SMA) em lâminas histológicas de corações dos grupos estudados analisados quatro semanas após o implante, foi observado um aumento significativo na densidade vascular nos grupos IGF-1+VEGF e VEGF em relação aos outros animais ($7,58 \pm 2,84$ vs. $7,00 \pm 2,59$ vs. $5,88 \pm 3,0$ vs. $8,92 \pm 2,94$ vs. $7,58 \pm 1,56$ vs. $83,25 \pm 9,53^*$ vs. $71 \pm 9,34^*$ vasos/campo, *p=0,0001, para os grupos Veículo, Polímero, Célula, Null, IGF-1, VEGF, IGF-1+VEGF, respectivamente). Além disso, o grupo IGF-1+VEGF é significativamente maior que grupo VEGF (Figura 21B). Foi observado um grande número de vasos nos grupos VEGF e IGF-1+VEGF quando

as imagens de VWF e SMA são sobrepostas sugerindo que neste estudo também houve maturação desses vasos recém formados (Figura 21A). É importante ressaltar que novamente neste estudo, não foi observada formação de hemangiomas em nenhum dos grupos tratados.

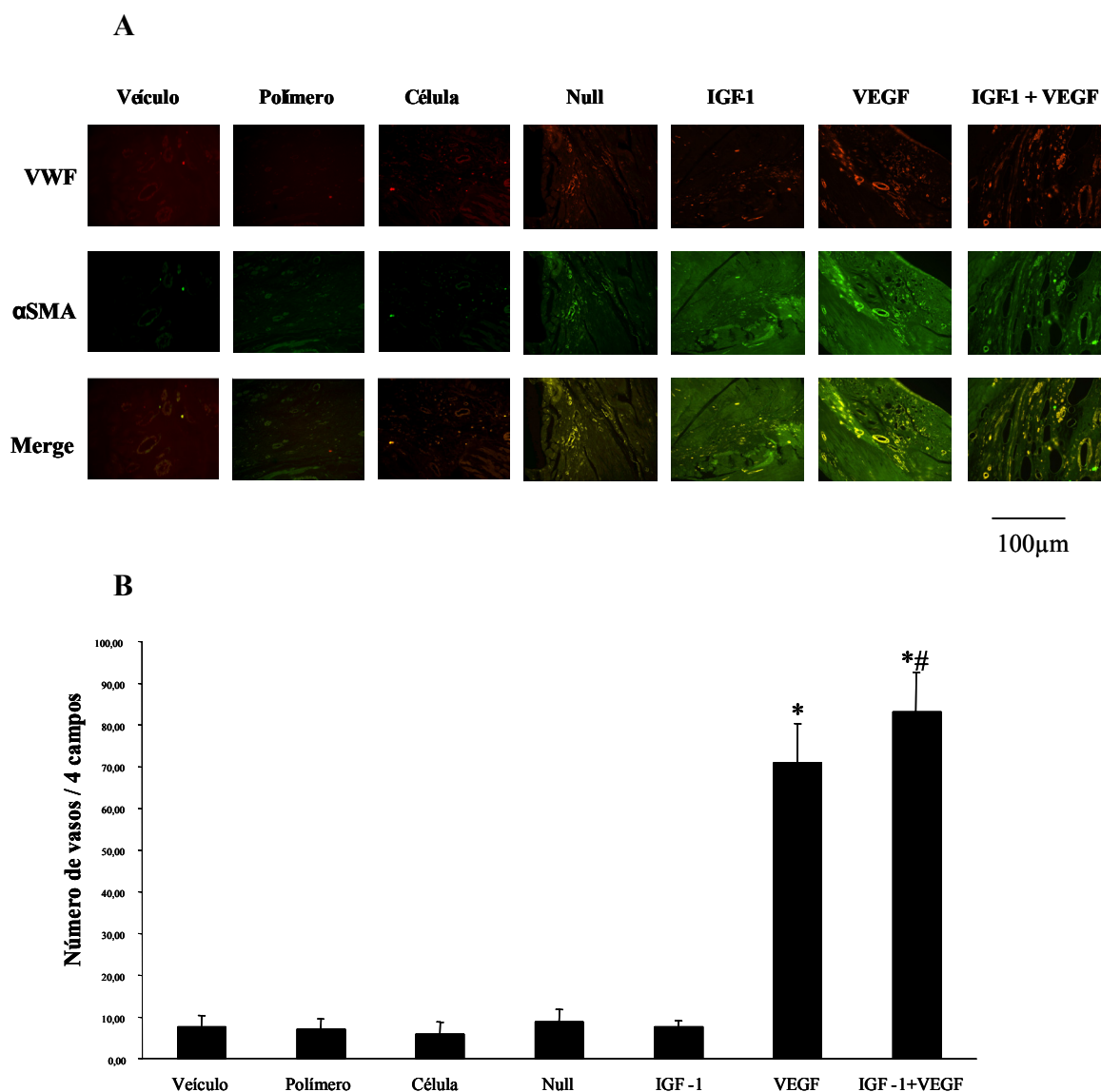


Figura 21: (A) Ensaio de imunofluorescência dupla marcação para detecção de vasculogênese. Observa-se um aumento significativo na densidade vascular nos grupos VEGF e VEGF+IGF-1 ($71 \pm 9,34$ e $83,25 \pm 9,53$; respectivamente). (B) As barras representam a média \pm erro padrão da média do número de vasos / campo. * $p=0,0001$ em relação aos outros grupos estudados e # $p=0,0001$ em relação ao grupo VEGF.

Determinação da área de colágeno.

A área cicatricial dos diferentes grupos foi definida como porcentagem do ventrículo esquerdo positivo para marcação de colágeno (*picrossírius red*), indicando a presença e a extensão de zona cicatricial. A avaliação da relação ventrículo esquerdo / cicatriz foi feita a partir da área total do ventrículo esquerdo (VE) e da área relativa à cicatriz. Observa-se que a relação cicatriz/VE foi menor no grupo de animais submetidos ao implante celular, onde as células foram previamente transduzidas com AdRSVVEGFP ($35,12 \pm 7,05$ vs. $31,28 \pm 5,03$ vs. $30,07 \pm 6,21$ vs. $25,89 \pm 2,92$ vs. $15,43 \pm 2,02^*$ vs. $16,07 \pm 1,83\%^*$, $*p < 0,05$, para os grupos Veículo, Polímero, Célula, Null, IGF-1, VEGF, IGF-1+VEGF, respectivamente) (Figura 22).

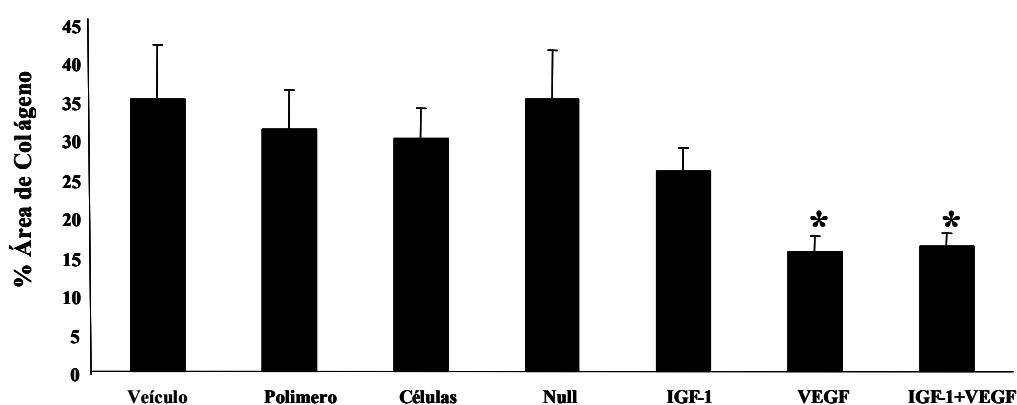


Figura 22: As barras representam a média \pm erro padrão da média da relação entre a área total do VE e a área relativa à cicatriz. $*p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo.

Estudo morfo-funcional por ecocardiograma e estudo hemodinâmico da função cardíaca.

O ecocardiograma (ECO) foi utilizado para estimativa do tamanho do infarto do miocárdio (IM), nas primeiras 24 horas pós-lesão – como critério de inclusão, onde animais com IM entre 20-40% de área acinética ou hipocinética entraram para o estudo, e também para análises de morfologia cardíaca 30 dias pós-implante celular. Após o período de 30 dias de infarto, os animais foram submetidos a avaliação morfológica por meio do exame de ecocardiograma. Os animais foram anestesiados, submetidos a tricotomia da face anterior do tórax, posicionados em decúbito lateral esquerdo para obtenção da imagem ecocardiográfica. Foram utilizadas as janelas paraesternal esquerda (corte longitudinal e transversal) e apical (quatro câmaras e duas câmaras). Foram realizadas as seguintes medidas de análise pelo modo-M: diâmetros do VE ao final da diástole (DDVE) e ao final da sístole (DSVE). Não foram evidenciadas alterações morfológicas que sugerem dilatação das câmaras cardíacas em sístole e diástole, bem como de espessamento da parede remanescente do VE (Figura 23).

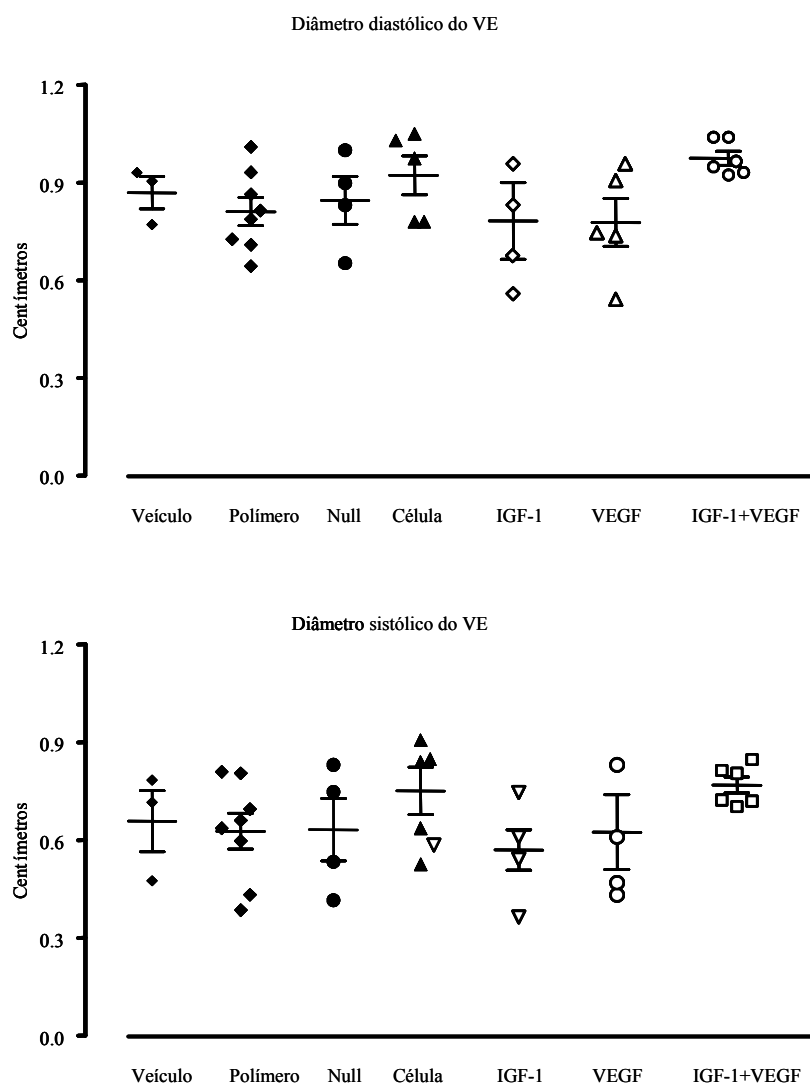


Figura 23: Exame ecodopplercardiográfico – análise pelo modo-M dos diâmetros do VE ao final da diástole (DDVE) e ao final da sístole (DSVE). Não houve diferença significativa dos parâmetros analisados entre os grupos.

Após avaliação ecocardiográfica, foram realizados os estudos hemodinâmicos como descrito previamente. Os resultados obtidos serão apresentados da seguinte forma:

- 1- BASAL (Parâmetros Sistólicos e Diastólicos)
- 2- SOBRECARGA POR ESTRESSE FARMACOLÓGICO (Parâmetros Sistólicos e Diastólicos)

BASAL

Os parâmetros sistólicos e diastólicos analisados durante o experimento hemodinâmico cardíaco com os animais mantidos em plano anestésico em situação basal apresentou-se sem diferença significativa importante entre os grupos estudados.

A tabela 6 descreve todos os parâmetros analisados durante o estudo: Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (PDFVE); Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo (PSVE); Primeira derivada temporal de pressão positiva e negativa (dP/dt+ e dP/dt-); Frequência Cardíaca (FC); Débito Cardíaco (DC); Volume sistólico (VS) e Trabalho Sistólico (TS). Apesar da diferença estatística encontrada na pressão sistólica do VE nos grupos Célula e Null em relação ao grupo Polímero, o conjunto dos dados sugerem que não há alterações significativas nos índices de função sistólica e diastólica, bem com nos parâmetros hemodinâmicos basais.

TABELA 6: Parâmetros hemodinâmicos e funcionais basais.

	Veículo	Polímero	Célula	Null	IGF-1	VEGF	IGF-1+VEGF	p
PDFVE	5±1	5±1	6±2	9±2	3±2	4±1	2±1	0,0672
PSVE	123±3	125±3	111±2 *	106±4 *	107±12	120±3	114±3	0,0022
dP/dt+	9122±568	8465±517	7971±470	7733±1005	7774±1863	9654±990	8893±644	0,5251
dP/dt-	-6093±215	-6009±314	-5666±401	-5723±465	-5197±1019	-6381±575	-6212±329	0,7521
FC	365±46	360±22	327±51	369±16	384±1	369±5	364±14	0,9410
DC	51±7	47±5	49±6	53±4	50±3	51±3	64±5	0,3543
VS	0,14±0,01	0,13±0,02	0,14±0,02	0,14±0,01	0,13±0,01	0,14±0,01	0,18±0,1	0,4948
TS	0,23±0,03	0,21±0,03	0,20±0,02	0,20±0,02	0,19±0,03	0,22±0,02	0,26±0,02	0,4175

* <0,05 comparado ao grupo Polímero.

SOBRECARGA POR ESTRESSE FARMACOLÓGICO

Os parâmetros sistólicos e diastólicos foram analisados durante o experimento hemodinâmico cardíaco com os animais mantidos em plano anestésico em situação de sobrecarga pressórica súbita, com injeção de fenilefrina (25-75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, *i.v. in bolus*, Sigma, St. Louis, MO, USA) suficiente para elevar a pressão sistólica em 60 a 80% em relação à basal. A análise posterior dos dados permitiu correlacionar as diferentes variáveis anteriormente mencionadas, podendo assim, avaliar a capacidade de ejeção cardíaca em condições basais e de sobrecarga pressórica.

A tabela 7 descreve todos os parâmetros analisados durante o estudo de função cardíaca mediante sobrecarga por estresse farmacológico: Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo (PDFVE); Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo (PSVE); Primeira derivada temporal de pressão positiva e negativa ($dP/dt+$ e $dP/dt-$); Frequência Cardíaca (FC); Débito Cardíaco (DC); Volume sistólico (VS) e Trabalho Sistólico (TS).

TABELA 7: Variações percentuais de parâmetros hemodinâmicos e funcionais durante sobrecarga por estresse farmacológico.

	Veículo	Polímero	Célula	Null	IGF-1	VEGF	IGF-1+VEGF	p
PDFVE	13±2	12±4	15±2	13±2	7±1 †	4±1 *	2±1 *	<0,0001
PSVE	78±3	61±2 #	69±3	64±3	74±6	63±2	73±3	0,0067
dP/dt+	37±17	41±8	34±10	31±13	56±13	58±14	71±9	0,1764
dP/dt-	4±25	-11±13	-16±18	-25±16	26±13	43±15	24±20	0,0502
FC	-0,3±2,7	0,0±1,4	-3,3±2,4	-0,8±0,6	0,3±2,3	-0,7±1,0	-2,4±1,5	0,7041
DC	-60±4	-54±3	-63±3	-56±3	-54±7	-13±5 \$	-24±3 \$	<0,0001
VS	-60±3	-54±3	-62±2	-56±3	-54±8	-12±5 \$	-22±3 \$	<0,0001
TS	-33±6	-31±4	-41±4	-32±4	-23±11	43±7 \$	34±5 \$	<0,0001

* <0,05 comparado a todos os outros grupos, menos ao grupo IGF-1. † <0,05 comparado ao grupo Célula. # <0,05 comparado ao grupo Veículo. \$ <0,05 comparado a todos os outros grupos.

É interessante ressaltar que não houve variação na frequência cardíaca durante a avaliação funcional, pois todos os animais foram vagotomizados. As variações da pressão sistólica do VE, induzidas por fenilefrina, foram semelhantes entre os grupos, apesar de discreta diferença encontrada no grupo Polímero em relação ao grupo Veículo. As variações da pressão sistólica do VE (PSVE) foi da ordem de 60 a 80 mmHg.

As medidas de inotropismo cardíaco (dP/dt+ e dP/dt-) não apresentaram diferença estatística significativa, porém os valores de pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), assim como os parâmetros hemodinâmicos (FC, DC, VS e TS) se apresentaram significativamente melhores nos grupos tratados com VEGF (grupos VEGF e IGF-1+VEGF) (Tabela 7).

As variações na pós-carga em indivíduos e em animais sadios provocam um aumento em TS e VS, já em situações de isquemia miocárdica, reagem diminuindo TS e

VS. No entanto, os grupos tratados com VEGF apresentaram uma resposta surpreendente; frente à sobrecarga pressórica por estresse farmacológico, a resposta foi um aumento em TS e VS, sugerindo melhora na função cardíaca.

Quando correlacionamos as variações de pressão sistólica, induzidas por sobrecarga farmacológica, com as mudanças do volume sistólico e do trabalho sistólico podemos observar que os grupos tratados com células transduzidas com o AdRSVVEGFP (grupos VEGF e IGF-1+VEGF) apresentam diferenças significativas nas inclinações das curvas (Figuras 24, 25 e 26, respectivamente).

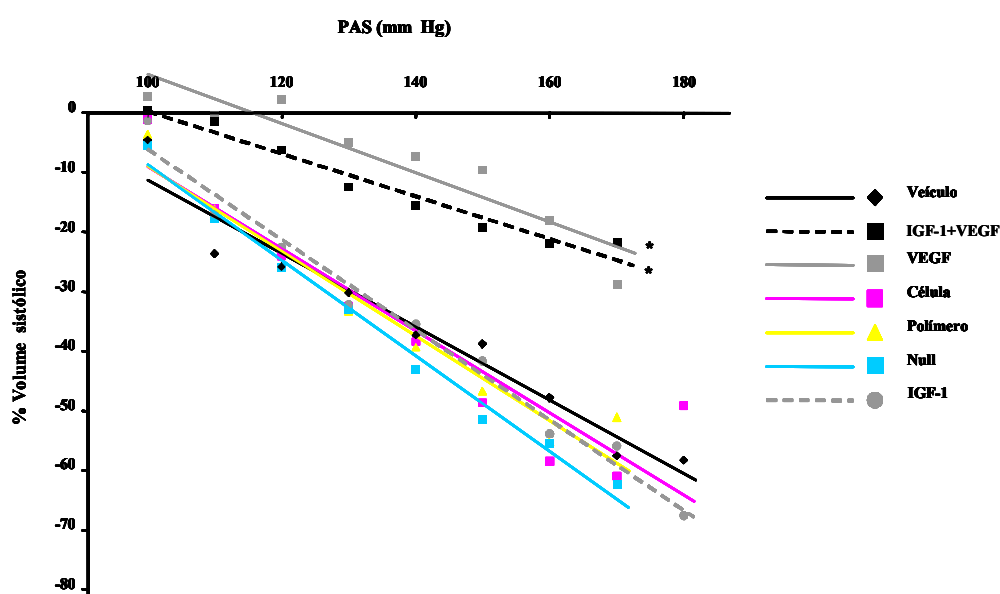


Figura 24: Correlação entre a Pressão Sistólica e a % de Volume Sistólico. * $p < 0,05$.

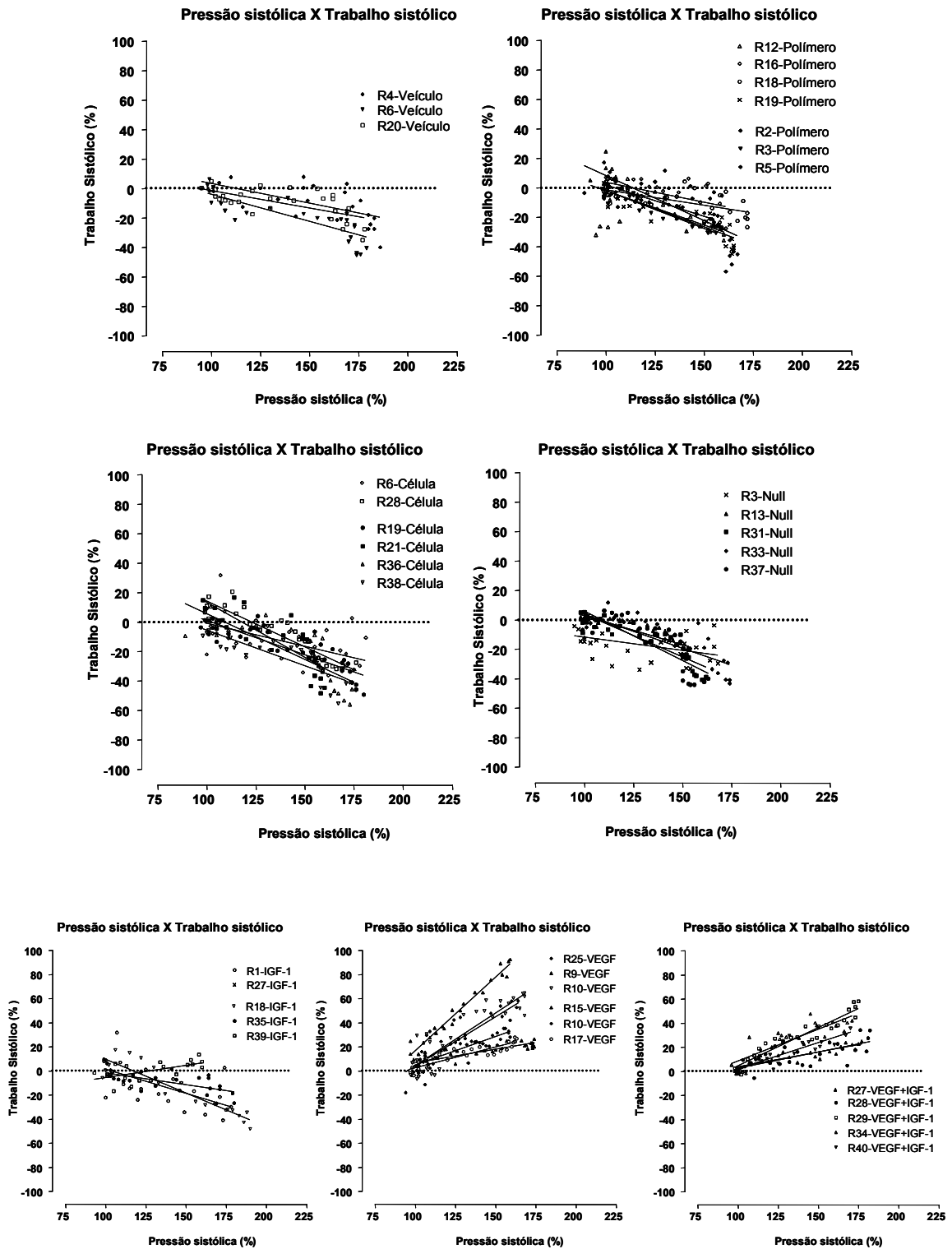


Figura 25: Correlação entre a Pressão Sistólica e a % de Trabalho Sistólico nos diferentes grupos experimentais.

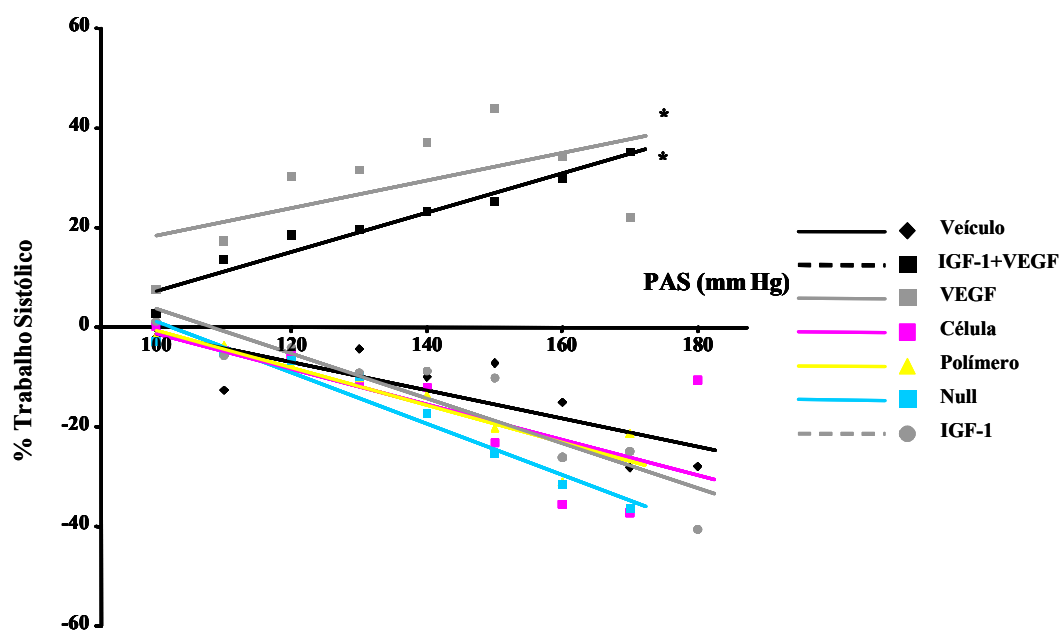


Figura 26: Correlação entre a Pressão Sistólica e a % de Trabalho Sistólico. * $p < 0,05$.

É interessante observar também que os grupos tratados com AdRSVVEGFEGFP (VEGF e IGF-1+VEGF) apresentam correlação significativas entre o número de vasos e as variações de PDFVE, assim como dos parâmetros funcionais (FC, DC, TS e VS) (Figuras 27 A e B e 28 A e B) na sobrecarga farmacológica.

Os dados mostram então que em situações de variação de pressão sistólica (pós-carga), os animais dos grupos VEGF e VEGF + IGF-1 encontram-se sempre distribuídos na ponta da direita de cada curva, o que significa que quanto maior o número de vasos, menor são as variações do Volume Sistólico, maiores e mais positivas são as variações de Trabalho Sistólico, menores são as variações do Débito Cardíaco e menores são as variações da PDFVE, frente à sobrecarga, sugerindo a vasculogênese seja responsável pela melhora de função cardíaca.

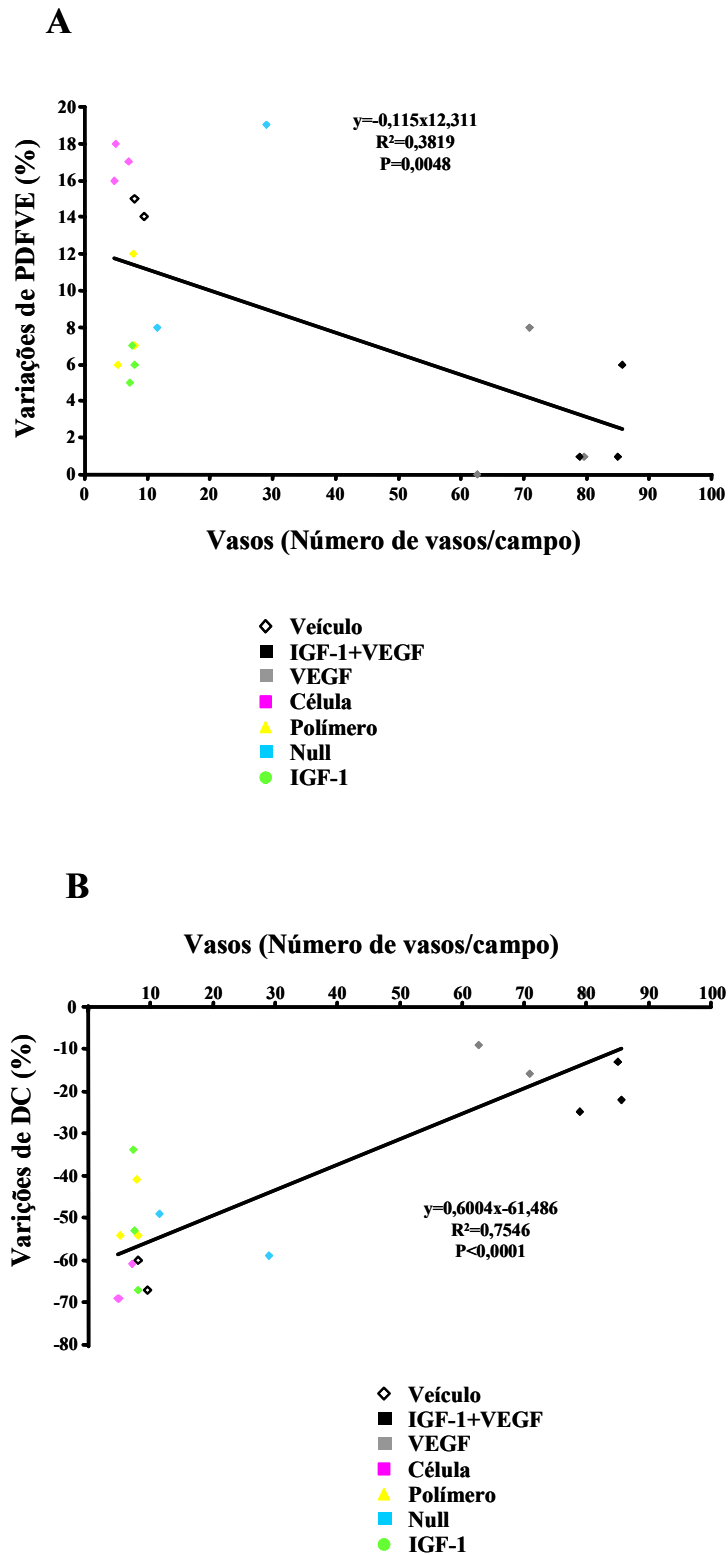


Figura 27: (A) Correlação entre número de vasos/campo e a % de variações de Pressão Diastólica Final (PDFVE). (B) Correlação entre número de vasos/campo e a % de variações de Débito Cardíaco (DC).

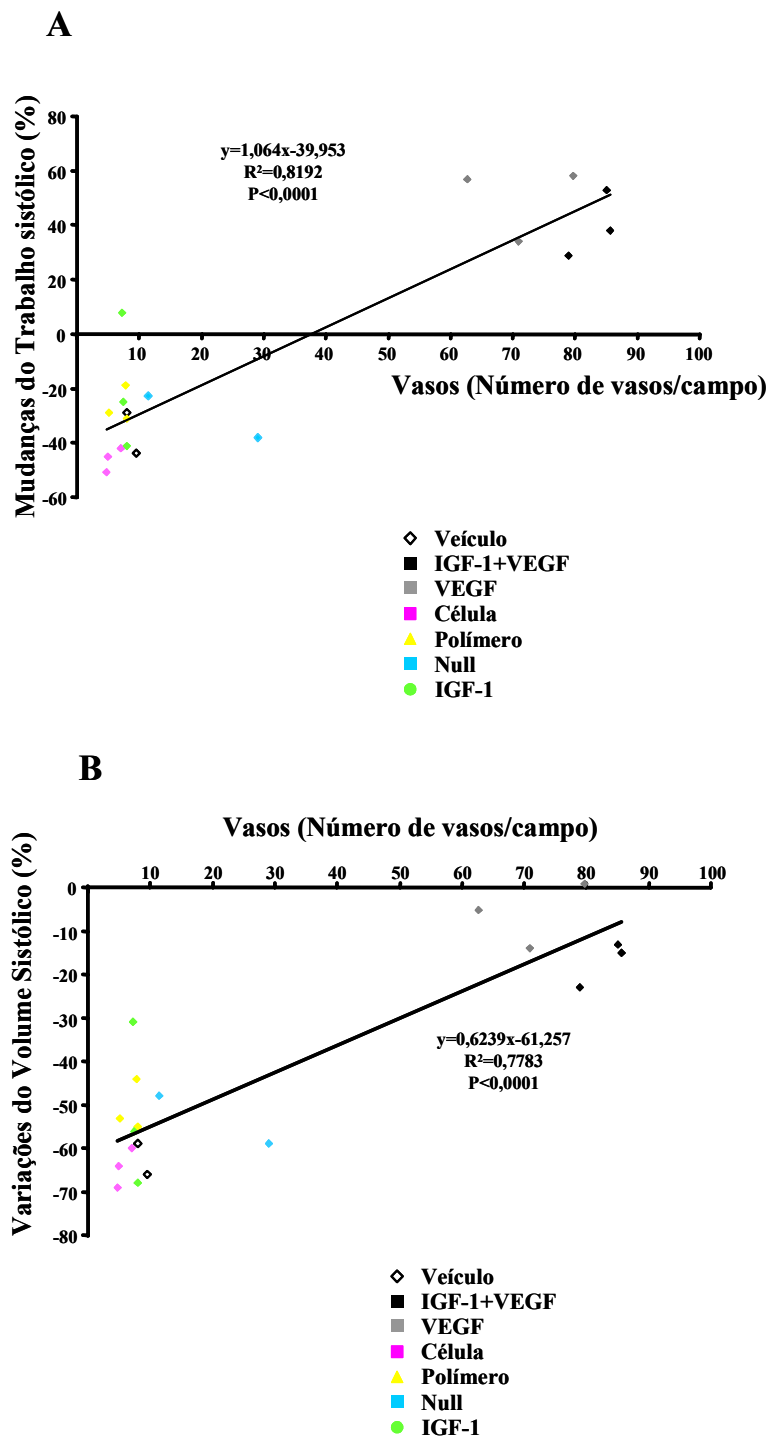


Figura 28: (A) Correlação entre número de vasos/campo e a % de mudanças de Trabalho Sistólico (TS). (B) Correlação entre número de vasos/campo e a % de variações de Volume Sistólico (VS).

5 . Discussão

Dados do Ministério da Saúde mostram que os infartos agudos do miocárdio juntamente com os casos de insuficiência cardíaca são responsáveis pela maior taxa de mortalidade, cerca de 35%, comparados com 10% de mortes por causas violentas, consideradas a segunda maior causa (OMS, 2005). Estes dados resultam em um impacto social e econômico bastante importante, ainda que um avanço importante tenha sido alcançado no tratamento clínico e cirúrgico nas últimas décadas.

As tentativas de se introduzir novas formas de tratamento na doença arterial oclusiva, através das técnicas de genômica representam uma importante oportunidade de amenizar estes problemas.

A cardiomioplastia celular tem sido proposta como maneira de prevenir o afinamento da parede miocárdica necrótica e expansão da lesão isquêmica, mas isso não previne o processo de isquemia no miocárdio. Nós hipotetizamos então, a combinação da cardiomioplastia celular com a terapia gênica utilizando fatores angiogênicos administrados previamente ao infarto do miocárdio como uma idéia para pacientes de alto risco que não são candidatos à cirurgia de revascularização (Lahan et al., 1999; Pettersson et al., 2000 e Udelson et al., 2000) ou em casos de terapia simultânea a revascularização (Gowdak et al., 2006).

A neovascularização induzida na presença da isquemia crônica é muito relevante clinicamente devido aos pacientes com doença arterial coronariana severa e função ventricular normal apresentarem fluxo sanguíneo basal normal (Stewart et al., 2006), porém a reserva coronariana não é suficiente em casos de aumento do consumo e/ou eventos isquêmicos, o que requereriam um aporte sanguíneo maior.

O uso de vetores virais diretamente no tecido baseado na administração do produto gênico tem sido altamente questionado devido a sérios efeitos imunogênicos. Reação adversa proveniente de inativação incompleta da maquinaria de replicação viral tem causado reações inflamatórias importantes (Murry et al., 1996; Askari et al., 2004 e Miyahara et al., 2006). É baseado nessas justificativas, que o uso de fibroblastos cardíacos mediando à administração do produto gênico pode ser um protocolo seguro para a terapia gênica. Então as células transduzidas podem ser totalmente caracterizadas “*in vitro*” antes do transplante para detecção de fatores de crescimento.

Neste estudo, exploramos as possibilidades terapêuticas baseadas no transplante de células com ou sem modificação das mesmas “*ex vivo*” por vetor adenoviral, contendo transgene de interesse, como o fator angiogênico (VEGF) e o fator de crescimento (IGF-1).

Os resultados obtidos em **Experimento 1 (“Proof of Principle”) – Teste de fisibilidade**, mostraram que nas condições experimentais onde ocorre isquemia cardíaca, a terapia celular associada ao aumento da expressão de fator angiogênico (VEGF) é capaz de induzir a formação de capilares e vasos.

Já, em **Experimento 2 – Teste de eficácia terapêutica**, os resultados obtidos mostraram que nas condições experimentais descritas, a terapia celular associada à expressão de fator angiogênico (VEGF) isoladamente, ou em associação à expressão de

um fator de crescimento (IGF-1) na presença de um biopolímero de fibrina contribuiu para diminuir o impacto da lesão provocada pela isquemia cardíaca, melhorando a função miocárdica, possivelmente associada ao aumento de densidade capilar (angiogênese) e vasculogênese e/ou efeitos autócrinos e parácrinos.

A avaliação de um possível efeito protetor na progressão do infarto do miocárdio relacionado ao aumento de circulação colateral atribuído ao implante celular, associado ou não à modificação gênica das células implantadas, foi precedida de estudos para determinação da expressão temporal do transgene repórter (*LacZ*).

Estes estudos foram realizados a partir do implante de mioblastos esqueléticos, fibroblastos cardíacos e de musculatura esquelética obtidos de biópsias de músculo esquelético e coração de ratos adultos, transduzidos com AdRSVLacZ, e implantados em coração de ratos isogênicos. A escolha deste modelo animal possibilitou minimizar uma possível rejeição e, portanto, mimetizar um implante células autólogas.

O estudo temporal da expressão do transgene *LacZ* apresentou padrões distintos entre mioblastos e fibroblastos. A expressão do transgene no miocárdio de ratos submetidos ao implante de mioblastos (1×10^6 células) transduzidos com AdRSVLacZ permaneceu até sete dias após a injeção, entretanto ao compararmos aos valores obtidos para a expressão do transgene quando os ratos são submetidos ao implante de fibroblastos (1×10^6 células) transduzidos com o mesmo vetor viral, verificamos que a expressão do transgene persiste até o quadragésimo quinto dia após o implante. Este fato é interessante ao considerarmos que a diminuição da expressão de um transgene “*in vivo*” normalmente está vinculada a uma resposta imunológica, desencadeada pelo vetor viral.

Nossos resultados mostram que esta resposta depende do tipo celular, isto é, fibroblastos obtidos de musculatura esquelética, submetidos ao mesmo ensaio, apresentaram tempo de expressão do transgene similar ao fibroblasto cardíaco. E mais, corroboram os resultados de Johnsson et al (2004), de que as células fibroblásticas apresentam deficiência de exposição de antígenos, fazendo com que o sistema imune tenha dificuldade a reconhecer estas células. Vale à pena ressaltar o potencial destas diferenças de expressão transgênica em situações onde o objetivo seja dependente do tempo.

Estes dados sugerem que o implante de fibroblastos na doença arterial oclusiva parece ser uma alternativa promissora, uma vez que o sucesso da terapia gênica depende do tempo de duração da expressão do transgene, entretanto há que se considerar que uma expressão transiente de um fator angiogênico nestas doenças pode ser o suficiente para a formação de novos capilares e vasos estruturados, como observado no presente trabalho.

O presente estudo objetivou manter a expressão de hVEGF e hIGF-1 no miocárdio por pelo menos 45 dias, através do implante de fibroblastos cardíacos expressando VEGF e/ou IGF-1, baseando-se então nos dados obtidos com o gene repórter.

A expressão por tempo aumentado e descontrolado de transgenes angiogênicos poderia levar a formação de hemangiomas e estimulação de angiogênese em tumores. A expressão em um tempo ótimo em células transplantadas pode ter uma duração suficiente para se obter o máximo efeito terapêutico. Então, para excluir a possibilidade de efeitos deletérios, como tumorigênese, muitos estudos têm sido acompanhados por um período longo de tempo. Baseado nesses estudos o vetor adenoviral foi o vetor de

escolha, característico por apresentar expressão episomal transiente do transgene inserido e capaz de transduzir fibroblastos cardíacos. Em adição, esse processo de terapia celular combinada é muito seguro, pois limita as respostas imunes dos vetores virais (Lima-Bessa, et al., 2006).

Fibroblastos da musculatura esquelética mostraram expressão do transgene por até 45 dias, porém fibroblastos cardíacos foram escolhidos devido à sua obtenção ser mais simples, por ser facilmente isolado e ser produzido facilmente em larga escala no laboratório. Por essas razões, a estratégia combinada pode sustentar a expressão da proteína por mais tempo.

A modificação das células “*ex vivo*” antes do transplante pode ser considerado um potencial efeito para aumentar a sobrevivência dessas células transplantadas e modificar seu efeito na angiogênese, no remodelamento de matriz ou no melhoramento da função.

Experimento 1 (“Proof of Principle”)-Teste de fisibilidade

Neste estudo foi evidenciado que fibroblastos cardíacos expressando hVEGF induzem formação de capilares e vasos quando comparado com o tratamento placebo, enquanto que a injeção de fibroblastos cardíacos somente ou associados ao AdCMVNULL (adenovírus sem o transgene de interesse) não resultaram em melhora significativa no modelo proposto. Esses resultados sugerem que neste modelo, as células atuam como um vetor para administração local dos produtos gênicos e que não possuem efeitos células-específicos.

O ensaio de imunofluorescência dupla-marcação nos tecidos para VWF e SMA mostrou uma grande proporção de vasos recém formados no grupo VEGF. Achados prévios utilizando vetores adenovirais em animais com deficiência imunológica mostraram que a administração de VEGF induz formação de capilares cardíacos imaturos que em uma semana involuem devido ao grande extravasamento de fibrina no tecido (Pettersson et al, 2000). Isto se deve em grande parte aos altos níveis do fator angiogênico obtidos neste modelo onde o adenovírus não é reconhecido pelo sistema

imune. Entretanto, um número grande de estudos experimentais subsequentes demonstrou que a resposta do VEGF é complexa, pode variar de acordo com o tecido-alvo, modo de administração e dosagem, mas de maneira geral observa-se estímulo a angiogênese. Isso pode ser atribuído à resposta obtida com fibroblastos cardíacos mediando a transferência gênica e a dosagem do VEGF, como mostra Von Degenfeld et al (2006), que estudou a importância da adequada distribuição e dosagem de VEGF no tecido-isquêmico para obtenção de vasos estáveis e funcionais. Ozawa et al (2004) demonstraram que há um discreto limiar de dosagem ($70\text{ng} / 10^6 \text{ cell/dia}$), para a formação de capilares estáveis e acima disso, há ocorrência de hemangiomas. Então, a administração contínua de VEGF, quando mantida abaixo desse limiar, pode resultar em angiogênese normal. No presente estudo o nível de VEGF circulante no grupo VEGF apresentou-se abaixo desse limiar. A expressão de VEGF pode estar envolvida com a secreção de outras citocinas do próprio fibroblasto cardíaco e eles podem ser os responsáveis pela maturação dos vasos sanguíneos.

Nossos dados corroboram também os de Niagara et al (2004), que evidenciaram um aumento de densidade capilar em membros inferiores isquemiados de coelho tratados com mioblastos de musculatura esquelética modificados geneticamente para produzir VEGF e/ou Ang-1 (*Angiopoietina-1*), os de Matsumoto et al (2005) que observaram um aumento no número absoluto de capilares em corações de ratos isogênicos infartados submetidos ao implante de células mesenquimais obtidas da medula óssea modificadas “*ex vivo*” para produzir VEGF e mais recentemente os de Ye et al (2007) que observaram aumento de densidade vascular e melhora de função miocárdica em ratos que receberam implante de mioblastos esqueléticos transduzidos com nanopartículas que superexpressavam VEGF.

Neste estudo foi demonstrado que: (1) o vetor adenoviral é eficiente na transdução de fibroblastos cardíacos de ratos, (2) a transferência do gene hVEGF₁₆₅ induz a formação de capilares e pequenos vasos com determinado pelo ensaio com VWF e SMA, respectivamente, (3) a injeção de um milhão de fibroblastos cardíacos expressando VEGF leva a uma significativa expressão do transgene e reduz a área de infarto. A redução da área infartada foi atribuída à injeção intramiocárdica de fibroblastos cardíacos modificados pelo adenovírus contendo o gene VEGF, limitando assim que o vetor adenoviral se espalhasse para outros órgãos.

Em resumo, nós demonstramos que o transplante no miocárdio de células geneticamente modificadas “*ex-vivo*” antes do evento isquêmico, resulta em aumento de expressão de hVEGF, detecção da proteína VEGF e formação de capilares no tecido quando comparado ao implante de fibroblastos cardíacos, fibroblastos cardíacos + AdCMVNULL ou tratamento placebo. Ainda que os infartos produzidos tenham sido de pequena magnitude, sem sinais evidentes de diminuição na performance cardíaca basal, detectamos uma significativa redução de área de infarto no grupo VEGF quando comparado ao grupo Veículo. Em conclusão, os dados mostram que a administração de fibroblastos cardíacos modificados geneticamente “*ex vivo*” para produzir fatores de crescimento tem o potencial de induzir resposta angiogênica em tecido cardíaco isquêmico.

Experimento 2 – Teste de eficácia terapêutica

Com base nos dados obtidos em **Experimento 1 (“Proof of principle”)- Teste de *fisibilidade*** e achados recentes de nosso laboratório de que o uso de um biopolímero de fibrina durante o transplante celular foi mais eficaz em aumentar a retenção de células no miocárdio, nós nos propusemos a testar:

1. O efeito **terapêutico** do transplante celular considerando a possibilidade de sinergia entre dois fatores, VEGF e IGF-1;
2. Testar a eficácia do transplante celular em associação com um biopolímero de fibrina;
3. Utilizar um modelo onde a lesão cardíaca é de maior magnitude e que se acompanha de comprometimento cardíaco funcional, em contraste com a estratégia utilizada até este momento que visava testar a possibilidade de modificar o “*milieu*”

cardíaco com a terapia de células geneticamente modificadas em presença de isquemia, mas sem comprometimento da função cardíaca importante.

Para esta etapa foram utilizados 40 animais, de um total de 68 animais utilizados para o estudo. Devido ao critério de exclusão adotado, de que somente animais com 20-40% de área acinética ou hipocinética ao exame Ecodopplercardiográfico 24 horas pós-ligadura fossem aceitos para o estudo, 28 animais desse total de 68 foram excluídos por não atingirem a porcentagem de área acinética ou hipocinética esperada ao exame.

É importante ressaltar que a escolha do tipo celular a ser utilizado neste trabalho foi devido a resultados anteriores e que não houve evidência de espessamento de parede miocárdica (devido ao uso de fibroblastos) ou hemangiomas em nenhum tecido dos animais estudados (devido ao implante com células modificadas para produzir VEGF).

Estes dados são explicados pelo pequeno número de células transplantadas, quando comparado a estudos que utilizam a célula como agente reparador, uma vez que a nossa estratégia utiliza células geneticamente modificadas “*ex vivo*” através de vetores adenovirais, o que torna a expressão do transgene episomal e transiente e que serão destruídas pelo sistema imunológico em semanas ou meses (Ozawa et al., 2004 e Szelid et al., 2002).

Portanto, as células são apenas vetores ou produtoras de fatores de interesse e não agentes de reparação “*per se*”. Além disso, as células fibroblásticas correspondem a 60% do número de células no miocárdio, sendo importantes para manutenção do arcabouço estrutural miocárdico (Kohl et al., 2005), diferentemente dos miofibroblastos,

que são células características de cicatriz (inclusive são importantes para o fortalecimento da mesma), ou seja, fibroblastos residentes que, na ocorrência de alguma lesão miocárdica são ativados, aumentando níveis de matriz extracelular, formando a necrose e são caracterizados principalmente pela presença de marcadores de músculo liso, chamado α actina de músculo liso (ASMA) (Squires et al., 2005).

A tecnologia do Biopolímero de fibrina foi uma estratégia interessante de apreensão das células no tecido cardíaco que possibilitou o uso do mesmo número de células para o implante (1×10^6 células), já que é importante ressaltar que os fibroblastos cardíacos foram utilizados como vetor para administração do transgene.

Segundo Ngan et al (2006) e Kelly (2005), os polímeros de fibrina inibem apoptose em caso de isquemia cardíaca quando usados diretamente no tecido. Isso é interessante, já que há grupos experimentais neste estudo com o gene IGF-1, descrito na literatura como um dos fatores chave no mecanismo de apoptose e sobrevivência celular (Kelley et al., 1996; Torella et al., 2004; Welch et al., 2002 e Bohl et al., 2000).

Neste estudo foi evidenciado que fibroblastos cardíacos expressando VEGF e a combinação dos dois fatores VEGF + IGF-1 ressuspendidas em polímero de fibrina induzem angiogênese e vasculogênese, quando comparados aos grupos que receberam os tratamentos placebo, polímero de fibrina, fibroblastos cardíacos somente, fibroblastos cardíacos + AdCMVNull (adenovírus sem o transgene de interesse) e fibroblastos cardíacos + AdCMVIGF-1EGFP. Esses dados corroboram os de Slomiany & Rosenzweig (2004) que observaram maior número de capilares retinianos nos animais que receberam tratamento com plasmídeos VEGF e/ou em combinação com IGF-1, e os dados de Jeschke & Herndon (2007) que observaram que o tratamento baseado em transferência gênica com IGF-1 e KGF (*keratinocyte growth factor*) causam

regeneração dérmica e epidérmica por efeitos autócrinos e parácrinos, principalmente devido ao IGF-1, que ativa HIF-1, gerando superexpressão de VEGF e neovascularização.

Em relação à área infartada no modelo proposto, somente os grupos experimentais que receberam tratamento com VEGF ou em combinação com IGF-1 apresentaram redução da mesma quando comparados aos grupos que receberam os tratamentos placebo, polímero, somente fibroblastos cardíacos e fibroblastos cardíacos + AdCMVNull, porém o grupo que recebeu fibroblastos expressando IGF-1 somente, não apresentou diferença significativa em relação a nenhum dos grupos tratados, contudo, podemos especular que há uma tendência à melhora podendo ser considerado um grupo “border line”. É importante ressaltar que o número de animais estudados neste grupo experimental foi inferior aos demais devido à obediência ao critério de exclusão adotado.

Têm sido propostos e utilizados vários índices para a avaliação da contratilidade, os quais são de crucial importância não só para os fisiologistas, mas também para os cardiologistas clínicos. Como regra geral, um índice é tanto melhor quanto maior a sua sensibilidade e especificidade. Assim, um bom índice de contratilidade deve mostrar-se altamente sensível a alterações da contratilidade ou inotropismo e ser o menos possível afetado por fatores extrínsecos ao coração, nomeadamente por variações da carga. Classicamente, os índices de contratilidade derivam da fase de contração isovolumétrica ou da fase de ejeção. Os primeiros tais como dP/dt positiva e negativa, revelam-se bastante sensíveis a alterações da contratilidade e, devido à sua natureza, insensíveis a alterações da pós-carga. São, contudo, altamente influenciados por variações da pré-carga. Os segundos, derivados da fase de ejeção, como por exemplo, a fração de ejeção,

o volume de ejeção e o débito cardíaco, mostram-se sensíveis a alterações quer da pré-carga, quer da pós-carga (Bonilha, et al., 2005).

É interessante salientar que não observamos alterações hemodinâmicas em qualquer dos grupos pela análise ecocardiográfica e até mesmo pelos métodos invasivos na situação basal. Em contraste, sob condições de estresse farmacológico evidenciamos diferenças claras entre os grupos, mostrando que aqueles que receberam VEGF isoladamente ou em combinação com IGF-1 tiveram uma melhora significativa em vários índices de função cardíaca.

Nossos resultados apontaram que, frente a uma sobrecarga pressórica súbita, os grupos que continham em seu tratamento células transduzidas com AdRSVVEGFP isoladamente ou em combinação com AdCMVIGF-1EGFP apresentaram melhor resposta funcional em relação aos outros grupos tratados quando os seguintes índices foram analisados: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), débito cardíaco (DC), volume sistólico (VS) e trabalho sistólico (TS), ou seja, a mesma variação de pressão sistólica consegue promover variações de VS e TS, o que sugere melhora funcional essa melhora pode ser atribuída à vasculogênese, já que esses mesmos animais apresentaram melhora funcional em relação ao número de vasos sanguíneos.

Nossos dados corroboram os dados de Ye et al (2007) que observaram melhora funcional do músculo cardíaco após o implante de mioblastos transduzidos com nanopartículas que superexpressavam VEGF, os de Mangi et al (2003) que observaram melhora funcional em ratos tratados com células mesenquimais de medula óssea transduzidas com vetor retroviral contendo o gene AKT (*activated protein kinase*) e ainda os dados de Stewart et al (2006), em seu estudo clínico em fase dois, que também

observaram melhora funcional cardíaca em pacientes infartados que receberam implante de AdVEGF₁₂₁ em comparação aos que receberam o máximo em tratamento médico.

Novamente, esses resultados, sugerem que neste modelo, as células atuam como um vetor para administração local dos produtos gênicos e que não possuem efeitos células-específicos.

Neste estudo foi demonstrado que: (1) a transferência dos genes VEGF e IGF-1 induzem a formação de capilares e também de pequenos vasos como determinado pelo ensaio com VWF e SMA, respectivamente; (2) a injeção de 1 milhão de fibroblastos cardíacos expressando VEGF e IGF-1 leva à uma significativa expressão do transgene e reduz a área de infarto. A redução da área infartada foi atribuída à injeção intramiocárdica de fibroblastos cardíacos modificados pelo adenovírus contendo o gene VEGF e IGF-1, limitando assim que o vetor adenoviral se espalhasse para outros órgãos.

6 . Conclusões

Em conjunto, os dados apresentados sugerem que:

A terapia celular combinada com o aumento da expressão de fator angiogênico (VEGF) ou em combinação com fator de crescimento (IGF-1) tem efeito benéfico, uma vez que estes fatores estimularam a proliferação capilar e vascular podendo contribuir para o aumento da circulação colateral, promovendo melhora funcional, limitando assim, progressão e extensão do infarto.

7 . Referências Bibliográficas

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, e cols. *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders*. N Engl J Med. 1994.

Allen S.J, Kim MG, Klug K, Park MH, Soonpaa LH. *Targeted expression of transforming growth factor-beta 1 in intracardiac grafts promotes vascular endothelial cell DNA synthesis*. J Clin Invest 95 (1995), pp. 114–121.

Arras M, Ito WD, W Schaper J. *Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb*. J. Clin. Invest. 101: 40-5. 1998.

Arsic N, Zacchigna S, Zentilin L, Correa-Ramirez G, Pattarini S, Salvi A, Sinagra G, Giacca M. *Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo*. Molecular Theraphy. 2004

Asahara H, Fujisawa K, Kobata T, Hasunuma T, Maeda T, Asanuma M, Ogawa N, Inoue H, Sumida T, Nishioka K. *Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium*. Arthritis Rheum. 1997 May;40(5):912-8.

Asahara T, Yano M, Fukuda S, Fukuda T, Nakahara H, Katayama K, Itamoto T, Dohi K, Nakanishi T, Kitamoto M, Azuma K, Ito K, Moriwaki K, Yuge O, Shimamoto F.

Brain metastasis from hepatocellular carcinoma after radical hepatectomy.

Hiroshima J Med Sci. 1999 Sep;48(3):91-4

Askari, S. Unzek and CK. Goldman et al., *Cellular, but not direct, adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor results in improved left ventricle function and neovascularization in dilated ischemic cardiomyopathy*, J Am Coll Cardiol 43 (2004) (10), pp. 1908–1914.

Barros, LFM.; Coelho, IJ.; Petrini, CA.; Chagas, ACP.; Rocha e Silva, M. *Myocardial reperfusion: Leykocyte in the ischemic and remote non-ischemic regions*. Shock. 13: 67-71. 2000.

Becker C, Lacchini S, Muotri AR, da Silva GJ, Castelli JB, Vassallo PF, Menck CF, Krieger JE. *Skeletal muscle cells expressing VEGF induce capillary formation and reduce cardiac injury in rats*. Int J Cardiol. 2006 May 1.

Bensenor IM, Lotufo PA. *Beyond the high mortality burden: targeting quality of life in Brazil*. Sao Paulo Med J. 2002 May 2; 120(3):67.

Berry, C., Murdoch, DR. & McMurray, JJV. *Economics of chronic heart failure*. Eur. J. Heart Fail. 3, 283-291 (2001).

Bohl D, Heard JM. *Delivering erythropoietin through genetically engineered cells*. J Am Soc Nephrol. 2000 Suppl 16:S159-62.

Bolontrade MF, Zhou RR, Kleinerman ES. *Vasculogenesis Plays a Role in the Growth of Ewing's Sarcoma in Vivo*. Clin Cancer Res. 2002 Nov;8(11):3622-7.

Bonilha AM, Saraiva RM, Kanashiro RM, Portes LA, Antonio EL, Tucci PJ. *A routine electrocardiogram cannot be used to determine the size of myocardial infarction in the rat*. Braz J Med Biol Res 2005 Apr;38(4):615-9.

Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR. *Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions*. Micron. 2006;38(6):580-3.

Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, Isner JM. *Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression*. J Clin Invest. 1996 Jan 15;97(2):469-76.

Buja LM, Entman ML. *Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease*. Circulation. 1998 Oct 6;98(14):1355-7.

Camelliti P, Borg TK, Kohl P. *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res. 2005 Jan 1;65(1):40-51. Review.

Carmeliet, P. *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature. V. 438, dec 2005.

Chomczynski, M., Sacchi, S. *Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis*. J Clin Invest., 84: 1470-1478. 1989.

Chuah MK, Collen D, VandenDriessche T. *Biosafety of adenoviral vectors*. Curr Gene Ther. 2003 Dec;3(6):527-43.

Consultar o site: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>

Conway EM, Collen D, Carmeliet P. *Molecular mechanisms of blood vessel growth*. Cardiovasc Res. 2001 Feb 16;49(3):507-21. Review.

Creamer D, Allen M, Sousa A, Poston R, Barker J. *Altered vascular endothelium integrin expression in psoriasis*. Am J Pathol. 1995 Dec;147(6):1661-7.

Davidson Y, Schmazh EM, Gu D, Zhang WW. *Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 92: 1401-5. 1995.

Debyser Z. *Biosafety of lentiviral vectors*. Curr Gene Ther. 2003 Dec;3(6):517-25.

Decker SJ. *Nerve growth factor-induced growth arrest and induction of p21Cip1/WAF1 in NIH-3T3 cells expressing TrkA*. J Biol Chem. 1995 Dec 29;270(52):30841-4.

Delafontaine P. *Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system*. Cardiovasc Res. 1995 Dec;30(6):825-34. Review.

Dib, J. *Does reperfusion injury exist in humans?* J. Am. Coll Cardiol., 21: 537-45. 2006.

Donohue JH. *Adverse outcome, with and without transfusion, for patients with malignancy*. Am J Surg. 1994 Aug;168(2):216.

Drake WP, Byrd VM, Olsen NJ. *Reactivation of systemic lupus erythematosus after initiation of highly active antiretroviral therapy for acquired immunodeficiency syndrome*. J Clin Rheumatol. 2003 Jun;9(3):176-80.

Duerr RL, Huang S, Miraliakbar HR, Clark R, Chien KR, Ross J Jr. *Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure*. J Clin Invest. Feb;95(2):619-27,1995.

Dvorak HF. *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy*. J Clin Oncol. 2002 Nov 1;20(21):4368-80. Review.

Engler, RL.; Dahlgren, MD.; Morris, D.; Peterson, MA.; Shmid-Schoenbein, G. *Role of leukocytes in the response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs.* Am. J. Physiol., 251: 307-313. 1986.

Esser S, Corada M, Dejana E, Risau W. *Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells.* J Cell Sci., 111: 1853-65. 1998.

Ferrara N, Alitalo K. *Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors.* Nat. Med., 5: 1359-64. 1999.

Folkman J, Shing Y. *Angiogenesis.* J Biol Chem. 1992 Jun 5;267(16):10931-4. Review.

Folkman J. *Fundamental concepts of the angiogenic process.* Curr Mol Med. 2003 Nov;3(7):643-51. Review.

Folkman J. *Tumor angiogenesis in women with node-positive breast cancer.* Cancer J Sci Am. 1995 Jul-Aug;1(2):106-8.

Folkman, J *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N. Eng. J. Med., v. 285, n. 21, 1182-1186, 1971a.

Folkman, J. *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis*. J. Exp. Med., v.133, n.2, 275-288, 1971b.

Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, LeRoith D, Lavandero S. *Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes*. J Biol Chem. 1997 Aug 1;272(31):19115-24.

Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. *Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb)*. Cardiovasc Res. 2000 Oct;48(1):89-100.

Frazier N, Houck KA. *The vascular endothelial growth factor family of polypeptides*. J Cell Biochem., 47: 211-8. 1991.

Freedman, SB. & Isner, JM. *Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease*, Ann Intern Med 136 (2002), pp. 54–71 [review].

Gaussin V, Depre C. *Myostatin, the cardiac chalone of insulin-like growth factor-1*. Cardiovasc Res. 2005 Dec 1;68(3):347-9.

Gerber BL, Lima JA, Garot J. *Magnetic resonance imaging of myocardial infarct*. Top Magn Reson Imaging, 11: 372-382. 2000.

Geutskens SB, Van der Eb MM, Plomp AC, Jonges LE, Cramer SJ, Ensink NG, Kuppen PJ, Hoeben RC. *Recombinant adenoviral vectors have adjuvant activity and stimulate T cell responses against tumor cells*. Gene Ther. Aug; 7(16):1410-6, 2000.

Gowdak LH, Buckberg G, Krieger JE; RESTORE Group. *Cell biology, MRI and geometry: insight into a microscopic/macrosopic marriage*. Eur J Cardiothorac Surg. 2006 Apr;29 Suppl 1:S259-65.

Greeg RO. *Bypass or amputation? Concomitant review of bypass arterial grafting and major amputations*. Am J Surg., 149: 397-402. 1985.

Habib, GB.; Hibig, J.; Forman, SA.; Bolli, R. *Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans: results of phase I Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial*. Circulation, 83: 739-746. 1991.

Hansen J. *Coronary collateral circulation: clinical significance and influence on survival in patients with coronary artery occlusion*. Am Heart J., 117: 290-295. 1989.

Haunstetter A, Izumo S. *Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease*. Circ Res. 1998 Jun 15;82(11):1111-29. Review.

Höckel, M., Schelenger, K., Kissel, T., Vaupel, P. *Therapeutic angiogenesis*. Arch. Surg., v. 128, n. 4, 423-429, 1993.

Horio T, Suzuki M, Takamisawa I, Suzuki K, Hiuge A, Yoshimasa Y, Kawano Y. *Pioglitazone-induced insulin sensitization improves vascular endothelial function in nondiabetic patients with essential hypertension*. Am J Hypertens. 2005 Dec;18(12 Pt 1):1626-30.

Isner JM, Vale PR, Symes JF, Losordo DW. *Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects*. Circ. Res., 89: 389-400. 2001.

Jaffer, FA, Sosnovik, DE., Matthias, N, Weissleder, R. *Molecular imaging of myocardial infarction*. Journal of molecular and Cellular Cardiology, (2006).

Jennings, RB.; Reimer, KA. *Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterail blood*. Circulation, 68: 25. 1993.

Jeremy RW, Stahl L, Gillinov M. *Preservation of coronary flow reserve in stunned myocardium*. Am J Physiol., 256: 1303-1310. 1989.

Jeschke MG, Herndon DN. *The combination of IGF-I and KGF cDNA improves dermal and epidermal regeneration by increased VEGF expression and neovascularization*. Gene Ther. 2007 Aug;14(16):1235-42.

Johnsson C, Gerdin B, Tufveson G. *Effects of commonly used immunosuppressants on graft-derived fibroblasts*. Clin Exp Immunol. 2004 Jun;136(3):405-12.

Johnsson C, Lorant T, Tufveson G. *Regulation of fibroblasts by activated and non-activated immune cells*. J Heart Lung Transplant. 2005 Dec;24(12):2170-8.

Jones MK, Kawanaka H, Baatar D. *Gene therapy for gastric ulcers with single local injection of naked dna encoding vegf and angiopoietin-1*. Gastroenterology, 121: 1040-7. 2001.

Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG. *Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics*. Int J Biochem Cell Biol. 1996 Jun;28(6):619-37. Review.

Kelly K. *The role of targeted agents in adjuvant therapy for non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res. 2005 Jul 1;11(13 Pt 2):5027s-5029s. Review.

Kimura H, Weiz A, Esumi H. *Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide*. Blood, 95: 189-97. 2000.

Kloner RA, Ellis SG, Carlson NV, Braunwald E. *Coronary reperfusion for the treatment of acute myocardial infarction: postischemic ventricular dysfunction*. Cardiology. 70: 233-46. 1983.

Kohl P, Camelliti P, Burton FL, Smith GL. *Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation*. J Electrocardiol. 2005 Oct;38(4 Suppl):45-50. Review.

Komarova NL, Mironov V. *On the role of endothelial progenitor cells in tumor neovascularization*. J Theor Biol. 2005 Aug 7;235(3):338-49.

Koren, G. Weiss, Y; Hasin, et al. *Prevention of myocardial damage in acute myocardial infarction by early treatment with intravenous streptokinase*. N. Engl. J. Med., 313: 1384-1389. 1985.

Ku, DD. *Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia*. Science 218: 576-578. 1982.

Laham, RJ, Sellke, FW. and Edelman, ER. et al., *Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial*, Circulation 100 (1999), pp. 1865–1871.

Lavalle, M. Cox, D. Patrick, TA.; Vatner, SF. *Salvage of myocardial function by coronary artery reperfusion 1, 2 and 3 hours after occlusion in conscious dogs*. Circ. Res., 53: 235-247. 1983.

Lee Q, Li B, Wang X, Leri A, Jana KP, Liu Y, Kajsura J, Baserga R, Anversa P. *Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress and cardiac hypertrophy.* J Clin Invest. 1997;100:1991-1999.

Lee, R.J., Springer, M.L., Blanco-Bose, W.E., Shaw, R., Ursell, P.C. and Blau, H.M., *VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression,* Circulation 102 (2000) (8), pp. 898–901.

Leung, DW; Goeddel, DV; Ferrara, N. *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogene.* Science, 246: 1306-1309. 1989.

Li B, Setoguchi M, Wang X, Andreoli AM, Leri A, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. *Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart.* Circ Res. 1999 May 14;84(9):1007-19.

Liew, CC. & Dzau, VJ. *Molecular genetics and genomics of heart failure.* Nature Reviews. Vol. 5, 811-825. 2004.

Lima-Bessa KM, Chigancas V, Stry A, Kannouche P, Sarasin A, Armelini MG, de Fatima Jacysyn J, Amarante-Mendes GP, Cordeiro-Stone M, Cleaver JE, Menck CF. *Adenovirus mediated transduction of the human DNA polymerase eta cDNA.* DNA Repair (Amst). 2006 Aug 13;5(8):925-34

Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. *Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis*. EMBO J. 2001 Feb 15;20(4):672-82.

Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. *Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts*. Nat Med. 2003 Sep;9(9):1195-201.

Matsumoto R, Omura T, Yoshiyama M, Hayashi T, Inamoto S, Koh KR, Ohta K, Izumi Y, Nakamura Y, Akioka K, Kitaura Y, Takeuchi K, Yoshikawa J. *Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jun;25(6):1168-73.

Mehta, JL.; Nichols, WW.; Donnelly, WH.; Lawson, DL.; Saldeen, TGP. *Acetylcholine and bradykinin after occlusion-reperfusion*. Circ. Res., 64: 43-54. 1989.

Menasche P. *Cardioplegic solution challenges*. Ital. Heart J., 3: 40-42. 2000.

Meoli D, Giordano F, Dione D, Su D, Sinusas S A. *Noninvasive imaging of myocardial angiogenesis following experimental myocardial infarction*. The Journal of Clinical Investigation, 2004: June. vol (113) (12).

Miao W, Luo Z, Kitsis R, Walsh K. *Intracoronary, adenovirus-mediated AKT gene transfer in heart limits infarct size following ischemia-reperfusion injury in vivo*. J. Mol. Cell Cardiol. 32, 2397-2402. 2000.

Miller, AD. *Progress toward human gene therapy*. Blood, 76: 271-278. 1990.

Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. *Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction*. Nat Med. 2006 Apr;12(4):459-65.

Mizuguchi H, Nakagawa T, Toyosawa S, Nakanishi M, Imazu S, Nakanishi T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Hayakawa T, Ijuhin N, Mayumi T. *Tumor necrosis factor alpha-mediated tumor regression by the in vivo transfer of genes into the artery that leads to tumors*. Cancer Res. 1998 Dec 15;58(24):5725-30.

Moises VA, Ferreira RL, Nozawa E, Kanashiro RM, Campos O, Andrade JL, Carvalho AC, Tucci PJ. *Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography*. Arq Bras Cardiol 2000 Aug;75(2):125-36.

Mori K, Ando A, Gehlbach P, Nesbitt D, Takahashi K, Goldstein D, Penn M, Chen CT, Mori K, Melia M, Phipps S, Moffat D, Brazzell K, Liao G, Dixon KH,

Campochiaro PA. *Inhibition of choroidal neovascularization by intravenous injection of adenoviral vectors expressing secretable endostatin*. Am J Pathol. 2001 Jul;159(1):313-20.

Mulligan, RC. *The basic science of gene therapy*. Science, 260: 926-932. 1993.

Murry, CE.; Kay, AK; Schuchartz, SM. *Muscle differentiation during repair of Myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD*. Clin. Invest. 98: 2209-2217. 1996.

Nachas, MM. & Shnitha, TK. *Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity*. Am J Pathol. 42: 379, 1963.

Neufeld AH, Shareef S, Pena J. *Cellular localization of neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) in the human and rat retina*. J Comp Neurol. 2000 Jan 10;416(2):269-75.

Ngan ES, Lee KY, Yeung WS, Ngan HY, Ng EH, Ho PC. *Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma*. Endocrinology. 2006 Jan;147(1):88-95.

Niagara I, Haider H, Pharm, Sim E. *Autologous skeletal myoblasts transduced with a new adenoviral bicistronic vector for treatment of hind limb ischemia*. Journal of Vascular Surgery, vol 4, number 4 (774-785).

Olivetti G, Abbi R, Quani F, Kajstura J, Anversa P. *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med., 336: 1131-411. 1997.

Organização Mundial da Saúde (OMS) (2005).

Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. *Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms*. Blood Cells Mol Dis. 2007 Sep-Oct;39(2):212-20.. Review.

Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM.. *Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis*. J Clin Invest. 2004 Feb;113(4):516-27.

Pachori, AL., Melo, LG., Hart, ML., Dzau, VJ. *Hipoxia-regulated therapeutic gene as a preemptive treatment strategy against ischemia/reperfusion tissue injury*. PNAS. V. 01., n. 33, 12282-12287, 2004.

Penn, M.S., Francis, G.S., Ellis, S.G., Young, J.B., McCarthy P.M. and Topol, E.J. *Autologous cell therapy for the treatment of damaged myocardium*, Prog Cardiovasc Dis 45 (2002), pp. 21–32.

Pettersson A, Nagy JA and Brown LF *et al.*, *Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor*. *Lab Invest* 80 (1): 99–115, 2000.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. *Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo*. *Nature*, 359: 845-8. 1992.

Rabbany SY, Heissig B, Hattori K, Rafii S. *Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization*. *Trends Mol Med*. 2003 Mar;9(3):109-17. Review.

Reynolds LP, Redmer DA. *Angiogenesis in the placenta*. *Biol Reprod*. 2001 Apr;64(4):1033-40. Review.

Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, Doetschman T. *Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies*. *Development*. 1988 Mar;102(3):471-8

Risau W. *Mechanisms of angiogenesis*. *Nature*. 1997 Apr 17;386(6626):671-4. Review.

Romson, JL.; Hook, BG.; Kunkel, SL. *Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog.* Circulation, 67: 1016-1023. 1983.

Rosengart TK, Lee LY, Patel SR. *Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease.* Circulation., 100: 468-74. 1999.

Rossen, RD. Swain, L.; Michael, LH. *Selective accumulation of the first component of complement and leukocytes in ischemic canine heart muscle.* Circ. Res., 57: 119-130. 1985.

Sabri, MN. Disciaccio, G., Cowley, MJ. *Coronary collateral recruitment: functional significance and relation to rate of vessel closure.* Am Heart J., 121: 876-880. 1991.

Schaper, W; Lewi, P. *DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog.* Circ Res., 28: 671-679, 1999.

Semenza GL. *Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis.* Curr Opin Genet Dev. 1998 Oct;8(5):588-94. Review.

Simiak T, Flores NA, Sheridan DJ. *Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury.* Eur. Heart J., 16: 160-70. 1995.

Simoons ML, Serruis PW, Van den Brand M. *Early thrombolysis in acute myocardial infarction: limitation of infarct size and improved survival*. J. Am. Coll Cardiol., 7:717-28. 1986.

Simpson PJ, Tood RF; Lucchesi BR. *Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (Anti-MO I, Anti-CD 116) that inhibits leukocyte adhesion*. J.Clin. Invest. 81: 624-629. 1988.

Slomiany MG, Rosenzweig SA. *IGF-1-induced VEGF and IGFBP-3 secretion correlates with increased HIF-1 alpha expression and activity in retinal pigment epithelial cell line D407*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004 Aug;45(8):2838-47.

Slunga L, Ericksson P, Osterman G. *Complete occlusion of the left main coronary artery: clinical and angiographic observations in five cases*. J Intern Med., 225: 123-7. 1989.

Smith N, Jacobs M, Ertl G and Schorb W. *Cyclooxygenase-2 in Myocardium Stimulation by Angiotensin-II in Cultured Cardiac Fibroblasts and Role at Acute Myocardial Infarction*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Volume 34, Issue 1, January 2002, Pages 29-37.

Snyder, WR; Hoover, J; Khoury, C. *Effect of agents used in perforation repair on osteoblastic cells*. J Endod. 1997 Mar;23(3):158-61.

Squires CE, Escobar GP, Payne JF, Leonardi RA, Goshorn DK, Sheats NJ, Mains IM, Mingoia JT, Flack EC, Lindsey ML. *Altered fibroblast function following myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol.* 2005 Oct;39(4):699-707.

Stack, RS.; Phillips, HR. III, Greenfield, JC. *Functional improvement of jeopardized myocardium following intracoronary streptokinase infusion in acute myocardium infarction. J. Clin. Invest.,* 72: 84-95, 1983.

Stewart DJ, Hilton JD, Arnold JM, Gregoire J, Rivard A, Archer SL, Charbonneau F, Cohen E, Curtis M, Buller CE, Mendelsohn FO, Dib N, Page P, Ducas J, Plante S, Sullivan J, Macko J, Rasmussen C, Kessler PD, Rasmussen HS. *Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF(121) (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. Gene Ther.* 2006 Nov;13(21):1503-11.

Svet-Moldavsky, GJ, Chimishkyan, KL. *Tumor angiogenesis factor for revascularization in ischemia and myocardial infarction. [Letter]. Lancet,* v.1, n.8017, p.913, 1977.

Szelid Z, Sinnaeve P, Vermeersch P, Gillijns H, Pellens M, Laurysens V, Van Pelt N, Flameng W, Sergeant P, Herijgers P, Pokreisz P, Van Zonneveld AJ, Verbeken E, Collen D, Janssens S. *Preexisting antiadenoviral immunity and regional myocardial*

gene transfer: modulation by nitric oxide. Hum Gene Ther. 2002 Dec 10;13(18):2185-95.

Tisher, E.; Mitchell, R.; Silva, M.; Abraham, J. *Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 165:1198-1206. 1989.

Tonnesen HH, Karlsen J. *Alginate in drug delivery systems.* Drug Dev Ind Pharm. 2002 Jul;28(6):621-30. Review.

Topper JN, Gimbrone MA Jr. *Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype.* Mol Med Today. 1999 Jan;5(1):40-6. Review.

Torella D, Rota M, Nurzynska D, Musso E, Monsen A, Shiraishi I, Zias E, Walsh K, Rosenzweig A, Sussman MA, Urbanek K, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A. *Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression.* Circ Res. 2004 Mar 5;94(4):514-24.

Tucci PJ, Faber CN, dos Santos L, Antonio EL. *Slow inotropic response of intact left ventricle to sudden dilation critically depends on a myocardial dialysable factor.* Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007 May-Jun;34(5-6):515-6.

Tunis SR, Bass EB, Steinberg EP. *The use of angioplasty, bypass surgery, and amputation in the management of peripheral vascular disease.* N Engl J Med., 325: 556-62. 1991.

Udelson, JE, Dilsizian, V and Laham, RJ et al., *Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease.*, Circulation 102 (2000), pp. 1605–1610.

Unthank JL, Nixon JC, Dalsing MC. *Nitric oxide maintains dilation of immature and mature collaterals in rat hindlimb.* J Vasc Res. 1996 Nov-Dec;33(6):471-9.

Van Benthuyzen, KM.; Mcmurtry IF.; Horowitz, LD. *Reperfusion after acute coronary occlusion in dogs impairs endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and augments contractile reactivity in vitro.* J. Clin. Invest., 79: 265-274. 1987.

Van Golen CM, Castle VP, Feldman EL. *IGF-I receptor activation and BCL-2 overexpression prevent early apoptotic events in human neuroblastoma.* Cell Death Differ. 2000 Jul;7(7):654-65

Van Golen CM, Feldman EL. *Insulin-like growth factor I is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis.* J Cell Physiol. 2000 Jan;182(1):24-32.

Villeval JL, Rouyer-Fessard P, Blumenfeld N, Henri A, Vainchenker W, Beuzard Y. *Retrovirus-mediated transfer of the erythropoietin gene in hematopoietic cells improves the erythrocyte phenotype in murine beta-thalassemia.* Blood. 1994;84(3):928-33.

Von Degenfeld G, Banfi A, Springer ML, Wagner RA, Jacobi J, Ozawa CR, Merchant MJ, Cooke JP, Blau HM. *Microenvironmental VEGF distribution is critical for stable and functional vessel growth in ischemia.* FASEB J. 2006 Dec;20(14):2657-9.

Wahlander H, Nordborg C, Nordlander M, Friberg P. *Functional and stereologic estimations of myocardial capillary exchange capacity in treated and untreated spontaneously hypertensive rats.* Acta Physiol Scand. 1992 Oct;146(2):165-75.

Weihrauch D, Arras M, Schaper J. *Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecroses in porcine myocardium.* Mol Cell Biochem., 147: 13-9. 1995.

Welch S, Plank D, Witt S, Glascock B, Schaefer E, Chimenti S, Andreoli AM, Limana F, Leri A, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA. *Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice.* Circ Res. 2002 Apr 5;90(6):641-8.

Williams DA, Nienhuis AW, Hawley RG, Smith FO. Gene Therapy 2000. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2000:376-393.

Wilson, MD; Johnson, KA. *Hypertension management in managed care: the role of home blood pressure monitoring*. Blood Press Monit. Oct;2(5):201-206, 1997.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS. *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 407: 242-8. 2000.

Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. *Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction*. Cardiovasc Res. 2000 Feb;45(3):630-41. Review.

Yau TM, Kim C, Li G, Zhang Y, Fazel S, Spiegelstein D, Weisel RD, Li RK. *Enhanced angiogenesis with multimodal cell-based gene therapy*. Ann Thorac Surg. 2007 Mar;83(3):1110-9.

Ye L, Haider HKh, Tan R, Toh W, Law PK, Tan W, Su L, Zhang W, Ge R, Zhang Y, Lim Y, Sim EK. *Transplantation of nanoparticle transfected skeletal myoblasts overexpressing vascular endothelial growth factor-165 for cardiac repair*. Circulation. 2007 Sep 11;116(11 Suppl):I113-20.

Construções e análises dos vetores virais (*AdRSVLacZ*, *AdRSVVEGFP*, *AdCMVNull* e *AdCMVIGF-1EGFP*).

Os vetores *AdRSVLacZ* e *AdRSVVEGFP* foram gentilmente cedido pelo grupo do Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, ICB-USP/SP, e previamente testado, quanto a sua capacidade de infectar e expressar o gene repórter em fibroblastos humanos.

A integridade de todas as etapas da construção viral foi avaliada por digestões com enzimas de restrição, seqüenciamento automático de DNA e PCR (dados não mostrados). A confirmação de que o vírus obtido era o *AdCMVIGF-1EGFP* veio das análises feitas por PCR para seqüências presentes no genoma viral. Os iniciadores utilizados confirmaram a presença do cDNA de IGF-1, EGFP e da fibra do adenovírus (um elemento estrutural). A ausência da região E1 do adenovírus corrobora com a qualidade não replicativa do vírus obtido, além de demonstrar que não existe contaminação, detectável por PCR, com adenovírus tipo 5 selvagem.

Propagação dos vetores virais

A transdução dos vetores virais (AdRSVLacZ, AdCMVVEGFP AdCMVNull e AdCMVIGF-1EGFP) em células empacotadoras (HEK 293) resultou em alterações morfológicas que foram visualizadas em microscópio óptico. As alterações morfológicas, denominadas de efeito citopático, foram observadas após 48 horas da transdução. Como controle da eficiência de transdução foram utilizadas células HEK293 mantidas sob as mesmas condições experimentais, exceto pela ausência do vetor viral (Figura 1).

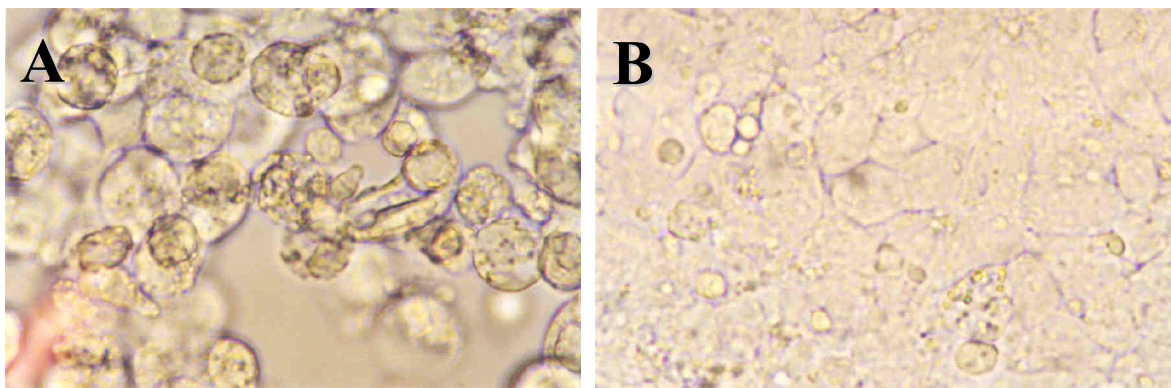


Figura 1: O quadro (A) representa o efeito citopático causado pela transdução do vetor AdRSVLacZ em células HEK293. O quadro (B) representa as células HEK293 mantidas em cultura sob as mesmas condições das células infectadas, exceto pela ausência do vetor. O efeito citopático observado corresponde a 48 horas após a transdução.

Titulação Viral (*AdRSVLacZ*, *AdRSVVEGFP*, *AdCMVNull* e *AdCMVIGF-1EGFP*).

A titulação viral, ou seja, a determinação quantitativa de vírus expressando o gene repórter *LacZ* ou EGFP, capazes de infectar células após 12 horas de contato, foi expressa em gtu/mL (gene transfer unit). Este protocolo pode ser utilizado para todos os vetores, pois as construções dos vetores que contém tanto o VEGF como o IGF-1 possuem o gene repórter EGFP, expressos a partir de um mesmo mRNA bicistrônico (Jackson *et al*, 1990). A titulação das soluções contendo os vetores virais foi realizada em células endoteliais de aorta de coelho (REC) (Tabela 1).

TABELA 1: A tabela representa a concentração das soluções virais utilizadas na transdução das culturas primárias de mioblastos ou fibroblastos. A expressão do gene *LacZ* foi visualizada após coloração *in vitro* com o substrato X-gal. A visualização da expressão do gene EGFP foi feita através de observação direta em microscópio de fluorescência.

Vetor	Título viral(gtu/mL)	Expressão <i>LacZ</i>	Expressão EGFP
AdRSVLacZ	>1x10 ¹⁰	Positivo	-
ADRSVVEGFP	>1x10 ¹⁰	-	Positivo
ADCMVIGF-1EGFP	>1x10 ¹⁰	-	Positivo

Os vetores utilizados para a transdução das células a serem implantadas no coração de rato foram testados na sua capacidade de transduzir 100% das células mantidas em cultura, isto é, cultura primária de mioblastos ou fibroblastos (Figura 2).

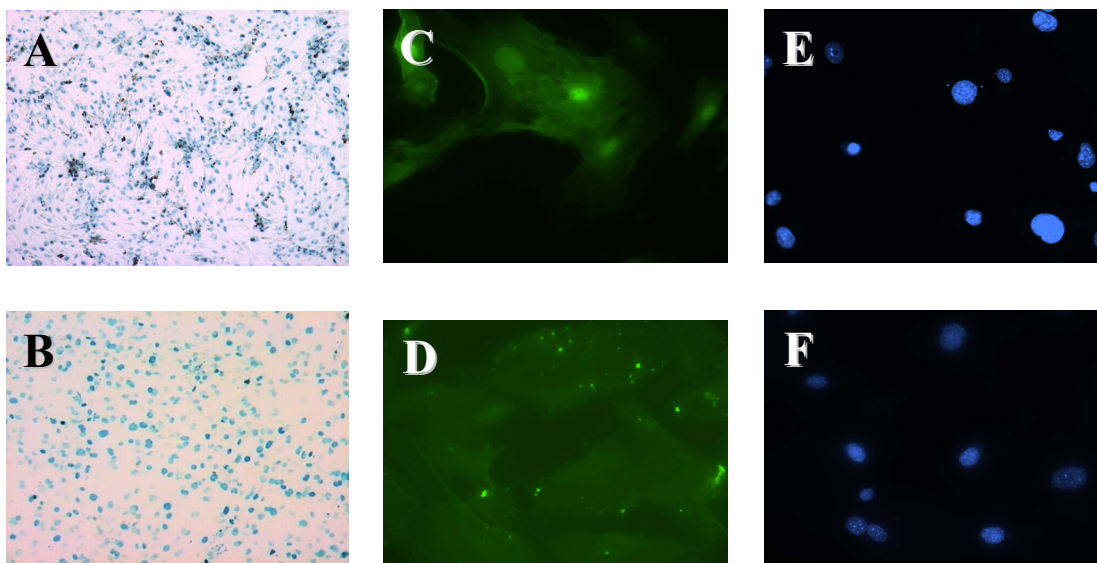


Figura 2: Os quadros representam mioblastos (A) e fibroblastos (B) transduzidos com AdRSV*LacZ*. Os quadros (C) e (D) representam fibroblastos cardíacos transduzidos com AdRSVVEGFP e com AdCMVIGF-1EGFP, respectivamente. Os quadros (E) e (F) representam fibroblastos cardíacos marcados com DAPI (marcador de núcleos celulares), onde é possível verificar que as células transduzidas com AdRSVVEGFP e com AdCMVIGF-1EGFP também apresentam marcação para DAPI. A visualização da marcação por DAPI e da expressão do gene EGFP foi feita através de observação direta em microscópio de fluorescência. A visualização da expressão do *LacZ* foi feita após contato das células com o cromógeno X Gal. Aumento: 400X.