

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**

# **REVASCULARIZAÇÃO PRECOCE DO BRÔNQUIO ISQUÊMICO MEDIANTE TERAPIA GÊNICA COM phVEGF 165**

**Maurício Guidi Saueressig**

Orientador: Prof. Dr. Amarilio Vieira de Macedo Neto  
Prof. Adjunto do Departamento de Cirurgia – UFRGS  
Pós-Doutorado Université Paris XI - França

Co-orientadora: Biol. Ursula Matte  
Doutora em Genética - UFRGS  
Coordenadora do Centro de Terapia Gênica – HCPA

## **Tese de Doutorado**

Porto Alegre/RS

Setembro/2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

O presente trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na vigência dos auxílios concedidos pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA) e pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da UFRGS. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) concedeu bolsa de doutorado ao autor. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) concedeu bolsa de iniciação científica a um pesquisador assistente.

*Para Anna Luiza, Antônio, Marilice,  
Patrícia e Felipe com muito carinho*

## AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa demarca a notável amizade que cultivei com pessoas realmente especiais do Centro de Terapia Gênica e da Unidade de Experimentação Animal no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para essas pessoas que tive a honra de conhecer e dividir minhas incertezas e acertos, nestes últimos quatro anos, nos quais não faltaram palavras carinhosas e de incentivo, ofereço este trabalho.

Agradeço, também

Ao **Professor Dr. Amarílio Vieira de Macedo Neto**, meu mestre e exemplo de médico. Já tinha compartilhado de sua amizade durante minha formação profissional e na orientação brilhante do meu mestrado. Sua inteligência para a solução dos problemas foi decisiva na conclusão desta tese. Também para você, meu amigo, dedico este trabalho;

à **Dra. Ursula Matte**, pesquisadora brilhante que conheci, talvez, por acaso. Mas, para minha sorte, tornou-se co-orientadora desta tese e minha amiga. Sua incrível percepção na condução dos experimentos e sua dedicação para com seus orientados são parâmetros a serem copiados e admirados;

à **Professora Roseli de Oliveira Möllerke**, ao veterinário **Marcos Eugênio Soares Duarte** e ao biólogo **Eduardo Mottola Amaro da Silveira**, pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos na Unidade de Experimentação Animal do HCPA;

à **Professora Dra. Elaine Fortis**, minha amiga, sua dedicação e maestria na condução da anestesia dos procedimentos experimentais foram fundamentais para a conclusão da tese;

à **Rosane Schlatter**, administradora do Centro de Pesquisas do HCPA por toda a colaboração na formatação dos orçamentos de pesquisa;

ao **Professor Dr. Cleber Dario Pinto Krue**, pela confiança depositada neste trabalho;

à **Professora Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss** e à **Professora Dra. Luise Meurer** pelo estímulo e apoio técnico na avaliação histológica e imunoistoquímica.

aos alunos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **Fabício Savegnago, Felipe H. de Souza, Jonas Dalabona, Letícia Franke, Douglas Westphal, Raquel Campani, Gabriela Pilau e Marcelo Paiva**, hoje amigos e pesquisadores que posso confiar;

ao **Dr. Alexandre Heitor Moreschi**, amigo e companheiro, sua colaboração facilitou o desenvolvimento deste trabalho;

à **Professora Fátima Ali**, pela assessoria na redação final da tese.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	10
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
1.1. O transplante pulmonar e a isquemia da via aérea.....	14
1.2. Circulação brônquica.....	16
1.3. Isquemia do brônquio doador.....	18
1.4. Revascularização do brônquio doador.....	21
1.5. Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF).....	23
1.6. Terapia gênica e o phVEGF 165.....	25
1.7. Neovascularização.....	29
1.8. Controle molecular e hemodinâmico da neovascularização.....	32
1.9. Angiogênese molecular terapêutica.....	33
1.10. Bibliografia.....	37
<b>2. RESUMO .....</b>	<b>53</b>
<b>3. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>56</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
5.1. Anestesia.....	58
5.2. Procedimento cirúrgico.....	58
5.3. Transferência do phVEGF 165 nu.....	62
5.4. Injeção do corante microvascular.....	65
5.5. Amostra do brônquio isquêmico.....	67
5.6. Histologia.....	67
5.7. Expressão protéica do VEGF.....	69
5.8 Expressão gênica do VEGF.....	71

5.9. Estatística.....	72
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
6.1. Macroscopia.....	75
6.2. Histologia.....	75
6.3. Expressão protéica do VEGF.....	78
6.4. Expressão gênica do VEGF.....	82
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>90</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>90</b>
<b>GLOSSÁRIO.....</b>	<b>98</b>
<b>PROJETO PILOTO.....</b>	<b>100</b>
<b>PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS E DIVULGAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>102</b>
<b>DESPESAS.....</b>	<b>104</b>



## LISTA DE TABELA

TABELA 1. Presença de revascularização sistêmica, número de vasos com látex e expressões gênica e protéica dos 17 segmentos de brônquio isquêmico analisados após três dias da transfecção com phVEGF 165 nu.....	77
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Dissecção hilar e broncotomia.....	60
Fig. 2. Terapia gênica do brônquio isquêmico.....	61
Fig. 3. Inserção do cDNA do VEGF 165 no plasmídio e transformação bacteriana.....	63
Fig. 4. Extração do plasmídio phVEGF 165.....	64
Fig.5. Fotos do momento da punção da aorta e do brônquio esquerdo do cão 14 (VEGF) após injeção do corante microvascular.....	66
Fig. 6. Foto do segmento de brônquio principal do cão 14 (VEGF), incluindo a região da anastomose, após três dias da terapia gênica.....	78
Fig. 7. Fotomicrografias mostrando a presença do corante na submucosa do brônquio isquêmico.....	76
Fig. 8. Fotomicrografias do brônquio principal após três dias da broncotomia.....	77
Fig. 9. Imunoistoquímica anti-VEGF.....	89
Fig. 10. Médias em UD da expressão protéica do VEGF na submucosa do brônquio isquêmico nos grupos controle e VEGF após três dias da broncotomia.....	80
Fig. 11. Correlação linear entre a intensidade da expressão protéica do VEGF (UD) e o número de vasos preenchidos com látex.....	81
Fig. 12. Foto do gel de agarose após a eletroforese do produto do RT-PCR. Cães 4 (controle) e 1 (VEGF) após três dias da broncotomia.....	83
Fig. 13. Expressão gênica. Médias em UR da razão densitométrica do VEGF/GAPDH nos grupos VEGF e controle.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ang – angiotensina.

BOS – síndrome da bronquiolite obliterante

cDNA– cópia ou clone de um ácido desoxirribonucleotídico

DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica

EGF – fator de crescimento epidérmico (*epidermic growth factor*)

Ephrin – efrinas

et al. – *et alii* – e outros

F – *french*; unidade de medida padronizada do diâmetro de uma estrutura tubular

FGF – fator de crescimento fibroblástico (*fibroblast growth factor*)

FGFrh – proteína recombinante do fator de crescimento fibroblástico humano

Flt – receptor tipo 1 para VEGF (VEGFR-1)

FR – frequência respiratória

G – *gauge*; unidade de medida padronizada de diâmetro ou espessura de um cateter

GM-CSF – fator estimulador de colônia para granulócito e monócito (*granulocyte and monocyte colony growth factor*)

HGF – fator de crescimento hepatocitário (*hepatocyte growth factor*)

HIF – fator de transcrição induzido pela hipóxia

HRE – elemento responsivo à hipóxia

IGF – fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin-like growth factor*)

IL – interleucina

IM – intramuscular

IN – inalatório

IV – intravenoso

Kb – kilobases (1.000 bases)

Kda – kilodaltons (massa molecular)

KDR – receptor tipo 2 para VEGF (VEGFR-2)

MCP-1 – proteína quimiotática para monócito (*monocyte chymotatic protein*)

MMP – metaloproteinase da matrix

n – número de animais de experimentação do grupo

NO – óxido nítrico

$p$  – probabilidade de erro tipo I

pb – pares de base nitrogenadas

PBS - tampão salina fosfato

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor*).

PLGF – fator de crescimento placentário (*placental growth factor*)

PO<sub>2</sub> – pressão parcial de oxigênio

PVA – polímero sintético acetato de polivinila

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucléico mensageiro

RT-PCR – *reverse transcription - polymerase chain reaction*

SC - subcutâneo

TAF – fator angiogênico de tumor

TGF – fator de crescimento de transformação (*transforming growth factor*)

Tie – fator expresso seletivamente no endotélio

TIMPS – inibidor tecidual de metaloproteinases da matriz. (*tecdual inhibitor of metalloproteinases*)

TNF – fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

VAC – volume corrente

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*)

VEGFR – receptor VEGF

phVEGF – plasmídio com VEGF humano

rhVEGF – proteína recombinante do VEGF humano

6p21.3 – braço curto do cromossomo 6 e *locus* 21.3.

® - marca registrada

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

O transplante pulmonar é o tratamento de escolha para as doenças pulmonares terminais como a DPOC, a fibrose pulmonar idiopática e a fibrose cística.

Os avanços na preservação do pulmão, na técnica operatória e na imunossupressão, durante a década de 80, fizeram com que os transplantes pulmonares se tornassem um procedimento seguro, saltassem para os atuais 1700 procedimentos por ano (totalizando 19.296 transplantes, até 2005, em mais de 100 centros espalhados pelo mundo) e atingissem níveis de sobrevida excelentes, nos primeiros três meses (91,2%), e razoáveis a médio prazo (62,9%/3 anos)<sup>(1-2)</sup>. Todavia, desde 1988, nos registros da *International Society for Heart and Lung Transplantation*<sup>(1)</sup>, a sobrevida, após o primeiro ano de transplante pulmonar, mantém-se com níveis extremamente baixos (41,6%/5 anos), se comparados ao de outros órgãos sólidos. Isto se deve principalmente à alta incidência (43 % após o 5º ano) de rejeição crônica na forma de BOS<sup>(1-2)</sup>.

Vários pesquisadores sugerem que a interrupção da circulação brônquica, além de fonte de problemas na anastomose da via aérea<sup>(3-7)</sup>, possa precipitar o desenvolvimento de bronquiolite obliterante, assim como agravar o fenômeno de isquemia-reperfusão e elevar a incidência de infecções, tornando-se, desta maneira, um fator prognóstico na sobrevida do paciente transplantado<sup>(8-9)</sup>.

Neste sentido, uma das abordagens atuais para melhorar os resultados dos transplantes pulmonares é atuar sobre a isquemia da via aérea e, sobremaneira, reduzir a incidência de rejeição crônica e de complicações na anastomose brônquica.

### 1.1. O transplante pulmonar e a isquemia da via aérea

Os primeiros experimentos com transplante pulmonar, descritos pelo russo Demijov, no clássico livro *Peresadka Sthisnenno Vasthnij Organov V Eksperimente* (Transplante Experimental de Órgãos Vitais), datam de 1947<sup>(10)</sup>. Dois anos após, Metras, durante seus estudos sobre técnicas de anastomose venosa do enxerto pulmonar, foi quem percebeu, pela primeira vez, a importância da vascularização brônquica para o êxito do transplante de pulmão<sup>(11)</sup>.

Na primeira experiência clínica de um transplante pulmonar, realizado por Hardy et al., em junho de 1963, o paciente sobreviveu apenas 18 dias<sup>(12)</sup>. Na necropsia, constatou-se que a isquemia da via aérea provocara uma necrose da parede posterior do brônquio doador. Não obstante, o impacto da isquemia brônquica no prognóstico do paciente transplantado tornou-se mais evidente nos 31 novos transplantes pulmonares, que se seguiram até 1978, à medida que 16 dos 20 pacientes que sobreviveram mais de uma semana apresentaram também complicações de extrema gravidade na anastomose da via aérea<sup>(13-15)</sup>. Desta maneira, nenhum destes procedimentos obteve sucesso: apenas um único paciente recebeu alta hospitalar, oito meses após o transplante, mas morreu logo após, devido à rejeição crônica, à sepse e pelo desenvolvimento de isquemia brônquica na forma de estenose da via aérea.

Diante das evidências inequívocas, a isquemia na via aérea doadora foi alçada à condição de principal responsável pelos resultados desfavoráveis e, conseqüentemente, tornou-se uma ameaça à continuidade dos transplantes de pulmão<sup>(13, 16-17)</sup>. Ademais, também contribuíam para os maus resultados o método rudimentar de preservação do enxerto, a imunossupressão ineficaz, o tratamento inadequado das infecções e o diagnóstico tardio da rejeição aguda<sup>(13, 18)</sup>.

Todavia, em 1981, a implantação dos dois pulmões com o coração, em bloco, numa paciente com hipertensão pulmonar, realizada pelo grupo de Stanford<sup>(19)</sup>,

juntamente com a introdução da ciclosporina, reacenderam as esperanças diante de uma nova perspectiva de tratamento dos pacientes com doenças cardiopulmonares terminais. A circulação colateral estabelecida pelas conexões pericarinais entre os vasos coronários e as artérias brônquicas garantiu, provavelmente, o sucesso do procedimento, pois proporcionaria uma melhor perfusão sanguínea da traquéia doadora com a redução da isquemia<sup>(13, 20)</sup>.

Em 1983, o grupo de Toronto retomou a técnica de implantação pulmonar unilateral, até então abandonada devido aos maus resultados no final da década de 70. A introdução da omentopexia<sup>(4, 21)</sup>, como método de revascularização indireta e de proteção mecânica da anastomose brônquica, associado a protocolos mais confiáveis de imunossupressão com a ciclosporina e de preservação do pulmão doador, juntamente com a seleção cuidadosa dos pacientes foram os motivos do sucesso de uma série inicial de cinco pacientes com fibrose pulmonar idiopática submetidos ao transplante unilateral<sup>(22)</sup>. O sucesso desses procedimentos também se deveu à ausência de complicações isquêmicas no brônquio.

A importância da circulação sistêmica para a correta cicatrização brônquica foi novamente exposta, em 1986, na publicação pelo grupo de Toronto<sup>(23-24)</sup>, a partir de uma série de pacientes submetidos ao transplante pulmonar bilateral em bloco com o objetivo original de evitar o enxerto sistemático do coração, em receptores sem disfunção do ventrículo direito. Apesar do resultado inicial promissor, a exclusão do coração, no bloco enxertado, impossibilitou a preservação das conexões coronário-brônquicas, o que recrudesceu a isquemia da via aérea e provocou quatro óbitos por necrose traqueobrônquica, além de deiscência parcial ou estenose da anastomose traqueotraqueal nos quatro sobreviventes, entre os 13 primeiros pacientes transplantados<sup>(25)</sup>.

Enquanto que o transplante unilateral se consolidava como procedimento padrão no enfisema e na fibrose pulmonar idiopática terminais, pacientes com pneumopatias sépticas e vasculares significantes precisavam da implantação



bilateral dos pulmões. Impelidos por esta necessidade, Patterson et al.<sup>(21)</sup>, Noirclerc et al.<sup>(26)</sup> e Pasque et al.<sup>(27)</sup> desenvolveram a técnica constituída de duas anastomoses brônquicas seqüenciais através da toracotomia anterior bilateral. Constituíram-se em acréscimos inestimáveis para o sucesso dos transplantes bilaterais seqüenciais o encurtamento do brônquio doador, a melhor exposição do espaço pleural e a dispensa da circulação extracorpórea. Também a observação de uma melhor cicatrização das anastomoses brônquicas, comparando-as à traqueotraqueal, esteve parcialmente relacionada ao melhor fluxo sanguíneo retrógrado, oriundo da circulação pulmonar.

Entre todos os avanços adquiridos<sup>(28-29)</sup>, Patterson et al.<sup>(5)</sup>, um dos mais renomados cirurgiões do momento, apontou, num editorial para um importante periódico médico, a melhor conservação da microcirculação brônquica, proporcionada pelos novos métodos de preservação tecidual, como a principal mudança técnica responsável pela redução das complicações da via aérea nos transplantes.

No entanto, a incidência de complicações isquêmicas nos transplantes mantém-se de 7% a até 27,4 %<sup>(8, 13, 23, 30-31)</sup>, atingindo uma mortalidade de até 3%<sup>(20)</sup>. Assim, mesmo com o progresso alcançado, a isquemia brônquica permanece como causa significativa de morbi-mortalidade nos transplantes pulmonares, conforme alertam pesquisadores destacados como Yacoub & Khaghani<sup>(32)</sup>, Trulock, Kaiser & Cooper<sup>(33)</sup>, Herold et al.<sup>(34)</sup> e Patterson, Cooper & Pearson<sup>(23)</sup>.

### *1.2. Circulação brônquica*

A circulação brônquica, descrita primeiramente por Galeno, no século II DC, ganhou, em 1513, no talento artístico e científico de Leonardo da Vinci, um esboço gráfico inédito para a época<sup>(35)</sup>.

Partindo-se da descrição anatômica para o estudo fisiológico, estima-se que o fluxo arterial brônquico é de  $3,8 \% \pm 2,7 \%$  do débito cardíaco, em condições normais<sup>(35-36)</sup>. As artérias brônquicas participam das respostas do pulmão a diversas condições fisiopatológicas como infecções, edema do interstício e do espaço aéreo (muitas vezes relacionado ao fenômeno de isquemia-reperfusão do pulmão enxertado) e até de trocas gasosas, na eventualidade da oclusão de uma ramificação da artéria pulmonar<sup>(34)</sup>.

Além do suprimento sangüíneo da via aérea e do parênquima pulmonar, é responsável também pelo suprimento arterial que abrange linfonodos mediastinais e intrapulmonares, pleura visceral, tecido conjuntivo mediastinal, esôfago, pericárdio, nervos simpático e vago, vasos da circulação pulmonar (*vasa vasorum*) e até miocárdio<sup>(9, 35, 37)</sup>.

Os pulmões têm como característica peculiar o duplo suprimento arterial. A circulação pulmonar cursa com uma pressão sangüínea ao redor de 25% da sistêmica e com baixa  $PO_2$  para poder realizar as trocas gasosas nos alvéolos, mas também auxilia a circulação brônquica com o suprimento de nutrientes nas pequenas vias aéreas; enquanto que, na circulação arterial brônquica, o sangue com alta  $PO_2$  mantém um fluxo elevado pelas artérias brônquicas, nutrindo os tecidos pulmonares até o terço inferior da traquéia. Essas duas circulações estão conectadas, através de amplas anastomoses, por toda a extensão das vias aéreas, no nível pré-capilar, capilar e pós-capilar<sup>(38)</sup>.

As artérias brônquicas seguem as divisões da via aérea até o bronquíolo terminal, formando um plexo peribrônquico, na adventícia, entre o parênquima pulmonar e a musculatura brônquica<sup>(39)</sup>. Os ramos arteriolariais do plexo peribrônquico, por sua vez, penetram na camada muscular e atingem a submucosa, formando um segundo plexo vascular, o submucoso. Esse plexo submucoso com grande capacidade de proliferação representa 10 % do volume tecidual da submucosa no nível segmentar da via aérea. Constitui-se de capilares retos de 8  $\mu m$

de diâmetro médio, sem fenestrações e com parede espessa e pericitos mais proeminentes do que da circulação pulmonar<sup>(35, 37)</sup>.

No homem, a apresentação anatômica mais comum são duas artérias brônquicas para o pulmão esquerdo e uma para o direito<sup>(35, 37)</sup>, originadas diretamente da aorta (84% das brônquicas esquerdas) ou das artérias intercostais (43 % das brônquicas direitas)<sup>(35, 40)</sup>. Porém, esta anatomia difere em outros mamíferos: no cão, por exemplo, as artérias brônquicas surgem da primeira à quinta artéria intercostal e, ocasionalmente, da sexta ou da sétima artéria intercostal<sup>(35, 38)</sup>; já no porco, emerge de um único tronco arterial da aorta<sup>(41)</sup>.

### *1.3. Isquemia do brônquio doador*

O pulmão é o único órgão sólido transplantado sem o restabelecimento imediato da circulação sistêmica e a conseqüente interrupção da circulação brônquica estabelece uma marcada isquemia da via aérea doadora<sup>(42)</sup>.

Está definido que a cicatrização adequada das anastomoses brônquicas depende da aplicação da técnica cirúrgica correta e, principalmente, de uma adequada microcirculação arterial<sup>(29)</sup>.

Logo, os problemas pela interrupção da circulação brônquica já estavam presentes desde os primeiros experimentos com autotransplante pulmonar<sup>(43)</sup>, em 1947 e 1951. Porém, foram os estudos experimentais de Pearson et al.<sup>(42)</sup>, de Rabinovich<sup>(44)</sup> e de Andrews & Pearson<sup>(45)</sup>, e séries clínicas de transplantes<sup>(13-15)</sup>, publicadas no final da década de 70, que, ao constatarem o impressionante impacto da interrupção da circulação brônquica sobre a via aérea doadora, chegaram a decretar a descontinuidade dos programas de transplantes pulmonares naquela época.

Com o aumento da experiência, identificaram-se outros fatores que influenciavam a qualidade da cicatrização brônquica, destacando-se o tipo de

imunossupressão, o método de conservação do pulmão, a desnutrição do paciente receptor, o tempo prolongado de isquemia fria, o edema de reperfusão e a corticoterapia<sup>(46-48)</sup>. Contudo, reiterou-se que a isquemia era a causa mais importante das complicações da via aérea<sup>(3, 8)</sup>.

O período de isquemia do enxerto pulmonar, que se estende até o retorno espontâneo da circulação brônquica, repercute em alterações morfológicas sobre a via aérea já nos primeiros dias. Verificou-se que, após a coleta do pulmão doador, já ocorria substancial queda do fluxo sanguíneo submucoso com reflexos sobre o epitélio respiratório do brônquio doador, na forma de cianose, edema e descamação já nos primeiros dias do transplante<sup>(42, 49)</sup>. Nas duas semanas seguintes, a via aérea permanecia em sofrimento isquêmico, recebendo apenas o fluxo retrógrado da circulação pulmonar<sup>(20)</sup>, a partir de anastomoses com a circulação brônquica<sup>(38)</sup>. Somente apareceriam sinais de retorno espontâneo da circulação arterial brônquica ao redor do 15º dia<sup>(42, 44, 46)</sup>.

É justamente neste período isquêmico que a via aérea doadora e a anastomose brônquica ficam sujeitas às complicações isquêmicas na forma de granulomas, necrose, malacia, estenose, fístulas e deiscências<sup>(34)</sup>. Nos estudos de autotransplante experimental, os problemas na anastomose atingiram de 50 % até 100 % dos procedimentos, muitas vezes se manifestando já nos primeiros dois dias<sup>(45, 3, 24, 50)</sup>, enquanto que, na experiência clínica, pelo menos 28 % das anastomoses apresentam áreas necrosadas com potencialidade para evoluir numa deiscência precoce, ou para malacia e estenose nos meses subseqüentes<sup>(13, 20, 14)</sup>.

Entretanto, o impacto da interrupção da circulação brônquica não se restringe ao brônquio doador. Atualmente, pesquisadores sugerem uma relação entre a interrupção da circulação brônquica e a maior incidência de rejeição aguda, de infecções e, principalmente, de bronquiolite obliterante<sup>(51-53)</sup>.

A bronquiolite obliterante (conhecida clinicamente como BOS) é a principal responsável pela baixa sobrevida, a médio e longo prazos, nos pacientes com

transplante pulmonar<sup>(51,54-55)</sup>. É uma manifestação de rejeição crônica, classicamente associada à rejeição aguda e à infecção por citomegalovírus<sup>(51)</sup>, mas evidências experimentais e clínicas mais recentes também sugerem a isquemia bronquiolar como outro fator causal da sua patogênese<sup>(51, 55-56)</sup>: no pulmão transplantado isquêmico, o endotélio ativado proliferaria, aumentando o tamanho dos vasos da submucosa e, conseqüentemente, estreitaria a luz bronquiolar com a progressiva limitação ao fluxo aéreo<sup>(55,57)</sup>. Adicionalmente, haveria uma maior passagem de células inflamatórias e citocinas através do endotélio ativado, contribuindo para a intensificação da inflamação crônica.

Quando avaliamos os resultados angiográficos e clínicos da reperfusão sistêmica precoce do brônquio doador, podemos vislumbrar uma perspectiva de solução para a bronquiolite obliterante. A revascularização direta do brônquio doador, embora tecnicamente laboriosa, foi empregada em 87 pacientes, até 1995, pelos grupos de Harefield<sup>(56)</sup>, Bordeaux<sup>(6)</sup> e Copenhagen<sup>(58)</sup>. As imagens angiográficas, com a circulação brônquica restabelecida até a periferia dos pulmões, demonstraram a potencialidade da revascularização com a exuberante rede vascular sistêmica em torno de toda árvore brônquica.

Além das evidências angiográficas, a relação causa-efeito entre isquemia e bronquiolite obliterativa parece mais evidente quando comparamos os resultados da técnica de transplante convencional com as séries que utilizaram a revascularização direta do brônquio doador: nos casos de revascularização direta, houve um acréscimo de pelo menos 25 %, na sobrevida a médio prazo<sup>(56, 58)</sup>, e uma incidência de BOS de 0% em 1 ano (grupo de Bordeaux)<sup>(6)</sup> a 4,5 % em 2 anos (grupo de Harefield)<sup>(56)</sup>; bem menor que os 26, 5 % de BOS, no período de 1 a 3 anos, publicados pelo *Registry of the Internacional Society for Heart and Lung Transplantation*<sup>(1)</sup>.

#### 1.4. Revascularização do brônquio doador

Segundo Nørgaard et al.<sup>(59)</sup>, a ausência de uma solução definitiva para as complicações isquêmicas da via aérea doadora continua afetando, negativamente, o prognóstico dos pacientes transplantados.

Historicamente, Metras<sup>(11)</sup> expôs sua preocupação com o retorno da circulação sistêmica na via aérea doadora quando adicionou, nos seus experimentos com transplante pulmonar canino, a revascularização direta mediante a confecção de um *patch* de aorta com os óstios das artérias brônquicas.

A experiência clínica acumulada e as descobertas experimentais<sup>(60, 4, 24)</sup> levaram ao surgimento de inovações técnicas que tiveram como objetivo minimizar as complicações isquêmicas da via aérea e do pulmão transplantado. A revascularização indireta pela omentopexia, o encurtamento dos brônquios doadores, a cobertura da anastomose com tecido conjuntivo peribrônquico, a telescopagem e as diversas técnicas de revascularização direta atestam a constante preocupação em evitar as complicações anastomóticas do brônquio<sup>(4, 20, 29, 61-64)</sup>.

Em relação à revascularização indireta, a omentopexia recebeu destaque no fim dos anos 80. Diversos centros transplantadores chegaram a adotar a omentopexia da anastomose brônquica na prática clínica<sup>(26, 29, 65)</sup>, mas o método, além de acrescentar inúmeras complicações (hérnia transdiafragmática e *ileus* prolongado, por exemplo) e aumentar o tempo transoperatório, estimulava um processo pífio de revascularização com o aparecimento de poucos vasos no 5º pós-operatório<sup>(28-29, 62-64, 66-67)</sup>. Desta forma, constituía-se mais num artifício de proteção mecânica da anastomose, em vez de proporcionar reperfusão brônquica precoce, não impedindo a exposição do brônquio doador a um período isquêmico que se estendia por quase uma semana. Logo, a omentopexia foi abandonada durante a década de 90.

Em 1992, o grupo de Bordeaux<sup>(68)</sup> fez ressurgir a revascularização direta como método de oferecer um fluxo sanguíneo sistêmico ao brônquio doador, já no primeiro dia de implantação, utilizando o enxerto de veia safena conectando a aorta descendente do receptor com um *patch* aórtico doador (incluindo as origens da artéria intercostobrônquica e, às vezes, da brônquica esquerda).

Entretanto, o método de revascularização direta também não foi adotado pela maioria dos grupos transplantadores, pois apresentava resultados divergentes e pouco reproduzíveis, talvez, conseqüências das técnicas de coleta e de implantação específicas, do aumento do tempo transoperatório (com conseqüências sobre o período de isquemia fria) e da necessidade de circulação extracorpórea (elevação do risco de sangramento pós-operatório)<sup>(29, 37, 52, 56, 58, 67, 69)</sup>. Assim, a maioria dos grupos transplantadores prefere aguardar por resultados clínicos mais definitivos antes da adoção rotineira da revascularização direta.

O desenvolvimento da biologia molecular fez surgir ferramentas como a terapia gênica, envolvendo genes de proteínas angiogênicas, que abriam perspectivas para novos protocolos de revascularização de tecidos isquêmicos. Estudos já investigaram o impacto da terapia gênica na prevenção da lesão por isquemia-reperfusão e da rejeição aguda em transplantes pulmonares<sup>(70, 71)</sup>, contribuindo para o conhecimento de vários aspectos pertinentes à inserção de material gênico estranho no pulmão transplantado. Contudo, a revascularização do brônquio doador isquêmico continua inexplorada.

A partir de trabalhos experimentais<sup>(72, 73)</sup> que evidenciaram sinais de neovascularização do tecido traqueal, após três dias da aplicação de FGFrh, levantou-se a possibilidade do emprego desta metodologia no tecido brônquico isquêmico. Ademais, torna-se mais plausível a revascularização molecular do brônquio pela transfecção tópica durante o transplante ou por broncoscopia pré ou pós-operatória<sup>(74)</sup>, posicionando o transplante pulmonar como um campo propício para a aplicação e o desenvolvimento de tecnologias em terapia gênica.

### 1.5. Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

Os primeiros experimentos com fatores angiogênicos se desenvolveram em meio a pesquisas oncológicas. Além do mais, vislumbrou-se a possibilidade da existência de moléculas angiogênicas durante a constatação de um intenso crescimento vascular que se seguia ao enxerto experimental de tumores. Essa suspeita viria a se confirmar, em 1971, com a purificação do primeiro fator angiogênico (TAF) por Judah Folkman<sup>(75)</sup>. Dezoito anos depois, foi a vez de Ferrara e Henzel identificarem o VEGF<sup>(76)</sup>. A seguir, descreveram-se inúmeros fatores angiogênicos (FGF, HGF, PLGF, PDGF, Ang, Ephrin, etc.), ao mesmo tempo em que se isolaram diversas moléculas anti-angiogênicas (angiostatina, TIMPs, endostatinas, etc.)<sup>(77-79)</sup>. Neste ínterim, com a evolução dos estudos, o VEGF chamou a atenção pelo seu grande poder angiogênico, exercido diretamente sobre a célula endotelial<sup>(80-81)</sup>.

O VEGF é uma glicoproteína básica homodimérica de 45 Kda com afinidade pela heparina<sup>(82)</sup>. O gene, localizado no cromossomo 6p21.3, tem a região codificadora com 14 Kb, organizada em oito exons, separados por sete introns<sup>(79, 83-84)</sup>. Um peptídeo de sinalização que precede a seqüência codificadora confere ao VEGF a secreção para o espaço extracelular<sup>(85)</sup>. Na medida em que o VEGF é uma proteína secretada, apresenta vantagens para terapia gênica, quando comparado a outros fatores angiogênicos, como o FGF, que permanece intracelular e, desta maneira, necessita de uma lesão tecidual para a liberação até o espaço extracelular<sup>(86-87)</sup>.

O padrão da síntese do VEGF depende do tecido e da situação fisiopatológica<sup>(88-90)</sup>. Entre os estímulos para síntese do VEGF, a hipóxia é o mais importante, visto que, além de aumentar a meia-vida do VEGF<sup>(79)</sup>, eleva, em até oito vezes, a transcrição do seu RNAm<sup>(91)</sup>. Adicionalmente, há outros fatores de transcrição (Sp, AP e Egr 1) que se ligam, igualmente, ao promotor do gene VEGF



em resposta a citocinas e outros estímulos fisiológicos (*stress* oxidativo e citocinas como o PDGF, por exemplo)<sup>(79, 88, 92)</sup>.

A principal fonte do VEGF são as plaquetas, mas também monócitos, macrófagos, células epiteliais e musculares de vasos e do miocárdio secretam o fator angiogênico<sup>(85, 87, 93)</sup>. Por outro lado, as células endoteliais, efectoras principais da angiogênese, só produzem pequenas quantidades de VEGF e na presença de anóxia<sup>(82, 94)</sup>.

Como muitos fatores de crescimento, o VEGF compreende uma família de citocinas. Até o momento, descreveram-se as seguintes isoformas do VEGF humano, originadas por *splice* alternativo do RNAm: VEGF-A (VEGF 165, VEGF 115, VEGF 121, VEGF 145, VEGF 183, VEGF 189 e VEGF 206), o VEGF-B (VEGF 167 e VEGF 189), VEGF-C (VEGF 419), o VEGF-D, o VEGF-E e o PLGF<sup>(79, 92, 95-98)</sup>. As isoformas se diferenciam na afinidade aos diversos receptores VEGFR, na intensidade de ligação aos proteoglicanos de matriz extracelular, no efeito biológico, na meia-vida, além do número total de aminoácidos<sup>(77, 79, 81, 92, 94, 99)</sup>.

Originado do *splice* alternativo sem o resíduo codificado pelo exon 6, o VEGF 165 se destaca pela sua excelente capacidade de difusão (apenas 50 % permanece ligado à matriz extracelular) e pelo marcado efeito biológico<sup>(79, 88, 92, 98)</sup>. Além de ser a mais abundante isoforma, considera-se o VEGF 165 fundamental para a viabilidade em um organismo humano, uma vez que realiza funções indispensáveis ao desenvolvimento vascular<sup>(81, 100-101)</sup>. O domínio de ligação à heparina e a ação de receptores acessórios (neuropilina 1 e 2) amplificam sua potência biológica, tornando-o a principal citocina responsável pelo surgimento, crescimento e organização da rede vascular embrionária (vasculogênese) e adulta (angiogênese)<sup>(98)</sup>. Adicionalmente, o VEGF 165 estimula a expressão dos receptores de adesão vascular, exerce efeito reparador e antiapoptótico sobre o endotélio, enquanto que promove vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular<sup>(89-90, 92, 102-104)</sup>.

O VEGF deve ligar-se ao seu receptor de membrana tirosina-cinase classe III (VEGFR) para efetuar suas ações. Apesar do VEGF executar seus principais efeitos biológicos sobre a célula endotelial, encontram-se também receptores VEGFR em células hematopoiéticas, nos osteoblastos, nos neurônios, nas células musculares lisas, no epitélio respiratório e na matriz extracelular<sup>(54, 78, 92, 98)</sup>.

Esses receptores VEGFRs são de três tipos: 1) VEGFR1, ou Flt-1, auxilia a organização vascular e o recrutamento de células progenitoras, mononucleares e inflamatórias<sup>(98)</sup>; 2) VEGFR-2, KDR ou Flk-1, é o principal executor das ações do VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D nos processos de angiogênese, hematopoiese, permeabilidade vascular, antiapoptose e linfangiogênese<sup>(92, 98)</sup>; e 3) VEGFR-3, ou Flt-3, ativa somente a linfangiogênese<sup>(79, 92, 96)</sup>. Já o estímulo de receptores acessórios (neuropilina 1 e 2) acarretaria a amplificação de alguns desses efeitos biológicos<sup>(79, 81, 92)</sup>.

### *1.6. Terapia gênica e o phVEGF 165*

A terapia gênica é uma nova modalidade terapêutica, fruto dos avanços recentes em biologia molecular, que consiste na introdução do cDNA numa célula-alvo e, a partir desta transfecção, a célula inicia a expressão deste gene estranho (transgene), resultando na produção suprafisiológica de uma proteína terapêutica. Essas características possibilitam uma alta concentração focal e a produção sustentada por semanas da proteína terapêutica, após uma única administração, no tecido alvo<sup>(78, 105)</sup>.

Em 1966, Edward Tatum teria definido que a abrangência de indicações da terapia gênica limitar-se-ia às doenças hereditárias com um gene defeituoso<sup>(106)</sup>. Entretanto, em 1990, o primeiro ensaio clínico com terapia gênica, que testou a transferência do gene da adenosina deaminase para tratamento de pacientes com deficiência desta enzima, deixou claro que a expressão apenas temporária do gene

inserido seria insuficiente para a correção de uma doença hereditária<sup>(107)</sup>. Assim, os estudos da terapia gênica voltaram-se para o tratamento de doenças adquiridas, adicionando e amplificando novas funções moleculares ou bloqueando um processo fisiopatológico já estabelecido.

Neste sentido, a BOS, a rejeição aguda e a isquemia da via aérea doadora são exemplos de complicações dos transplantes pulmonares com possível tratamento baseado em terapia gênica.

Até março de 2006, o *Medline*<sup>(108)</sup> indexou mais de 850 trabalhos experimentais com terapia gênica em pulmão, entre os quais destacam-se aqueles que abordaram os métodos de transfecção e os vetores nos modelos de transplante pulmonar<sup>(71, 109)</sup>, a imunossupressão para rejeição aguda<sup>(71, 110)</sup>, a prevenção das lesões pulmonares por isquemia-reperfusão<sup>(111-112)</sup> e a redução das manifestações de rejeição crônica em modelos experimentais de bronquiolite obliterativa<sup>(110, 113)</sup>. Entretanto, nenhum trabalho procurou resolver a isquemia da via aérea doadora.

A estruturação de um protocolo de terapia gênica inicia-se pela escolha do microambiente tecidual correto para transfecção e pela eficiência com que o cDNA (inserido num plasmídeo) penetra na célula-alvo<sup>(87)</sup>. O potencial efeito biológico de uma terapia gênica poderá ser subestimado se o local e o meio escolhido da transfecção forem incorretos como um microambiente com baixa densidade de receptores angiogênicos ou uma quantidade mínima de plasmídios (<10<sup>5</sup> plasmídios/célula) que atingem as células-alvo<sup>(78, 114)</sup>.

A disposição anatômica do brônquio principal traz vantagens para o desenvolvimento das mais variadas táticas de transferência gênica, como a broncoscópica, *ex-vivo*, ou durante a confecção da anastomose brônquica. Além das facilidades para a transferência gênica, há um ambiente propício para a potencialização da transfecção local da submucosa brônquica isquêmica com gene VEGF (cDNA): a grande densidade de receptores VEGFR, a anatomia da via aérea (plexo vascular localizado na submucosa e proximidade do epitélio com potencial de

secretar VEGF) e a facilidade da aplicação tópica do plasmídeo intensificam o efeito terapêutico do VEGF e reforçam a escolha pelos protocolos de aplicação local da terapia gênica para a via aérea<sup>(74, 102, 104-105, 115-117)</sup>.

Para o sucesso da terapia gênica com VEGF no brônquio doador, as seguintes diretrizes devem estar contempladas: 1) expressão gênica eficiente, reproduzível e uniforme; 2) ausência de toxicidade; 3) especificidade para a célula-alvo; 4) método de transferência gênica simples e, de preferência, simultânea a um procedimento de diagnóstico (broncoscopia, por exemplo) ou terapêutico (cateterismo ou coleta do órgão para transplante, por exemplo); 5) potência terapêutica adequada (relacionada à eficiência da transfecção e ao tempo de expressão gênica); 6) vetor de expressão eficiente<sup>(78, 107, 114)</sup>.

Na escolha do plasmídeo (vetor de expressão), devem ser levados em consideração os obstáculos comuns (envelope nuclear e enzimas lisossômicas, por exemplo<sup>(119)</sup>) ou específicos (cartilagem brônquica<sup>(118)</sup>) de cada tecido para a inserção de um gene estranho, assim como o tamanho do plasmídeo (maiores de 2kb apresentariam mobilidade diminuída no citosol<sup>(119)</sup>).

Os primeiros protocolos de terapia gênica empregaram o plasmídeo nu (DNA *naked*), isto é, um protocolo mais simples sem vetores de transferência<sup>(106-107)</sup>. Como o plasmídeo nu depende de fenômenos de endocitose, fagocitose ou macropinocitose para a sua internalização no citosol de uma célula-alvo, o resultado esperado é uma eficiência baixa de transfecção com apenas 1% dos plasmídios penetrando no citoplasma<sup>(78, 119)</sup>. No núcleo celular, o plasmídeo aproveita-se do armamentário enzimático disponível para iniciar a transcrição do transgene (a partir de 8h a 12h após a transfecção do phVEGF, por exemplo) sob controle do sítio promotor de expressão gênica contido no plasmídeo. No momento em que este promotor é silenciado, após algumas semanas, cessa-se a expressão do gene terapêutico<sup>(78, 105, 120-121)</sup>.

Em 1989, o clone de cDNA do VEGF 165 humano foi isolado pela primeira vez por Leung et al.<sup>(97)</sup>. Com a confirmação de sua capacidade de estimular a proliferação endotelial pelo próprio Leung et al.<sup>(97)</sup>, Takeshita et al.<sup>(115)</sup> e Tsurumi et al.<sup>(122)</sup> testaram com sucesso o cDNA do VEGF 165 inserido no plasmídio nu pUC118 (phVEGF 165). Esses pesquisadores comprovaram, através de uma expressão gênica de 21 a 28 dias, um grande efeito biológico do VEGF, mesmo utilizando um plasmídio extenso (mais de 4 Kb) com baixa taxa de transfecção (0,5%). Os bons resultados deste sistema de transferência explicam-se, parcialmente, pelo efeito parácrino das moléculas da proteína terapêutica secretada, traduzindo a alta potência biológica do VEGF<sup>(97, 99, 104)</sup>.

No intuito de aumentar a eficiência da terapia gênica, desenvolveram-se vetores de transferência para facilitar a entrada do cDNA na célula, reduzir sua instabilidade no citosol e prolongar o tempo de expressão gênica no núcleo<sup>(119, 123)</sup>. Por enquanto, há duas categorias de vetores de transferência de plasmídios: 1) vetores virais (retrovírus, adenovírus, etc.) e 2) não virais (lipossomo, polímeros de liberação lenta, etc)<sup>(115)</sup>. Desta maneira, através do encapsulamento em partículas lipídicas (lipossomo<sup>(119)</sup>), ou aproveitando as proteínas virais para penetrar na membrana plasmática<sup>(123)</sup>, um maior número de células podem ser transfectadas (3,1% até 7,4 % das células-alvo) e mais plasmídios penetram no núcleo celular<sup>(123)</sup>.

Apesar dos avanços recentes, não se chegou a um vetor ideal para o VEGF. Embora os vetores virais sejam considerados os mais eficientes podem, por exemplo, integrar-se ao genoma humano, produzindo mutagênese insercional (retrovírus), e provocar reação inflamatória com destruição da célula transfectada (adenovírus)<sup>(87, 119)</sup>. Em especial, nos pacientes transplantados sob imunossupressão, há o risco do surgimento de subtipos com capacidade de replicação a partir de recombinação homóloga. Entre os efeitos adversos, descritos em ensaios clínicos com vetores virais, destacam-se reações inflamatórias e alérgicas, febre, aumento de transaminases e até o desenvolvimento de leucemia<sup>(78)</sup>. Assim, todas as

evidências apontam para a necessidade de mais estudos de segurança antes da utilização clínica desses vetores na angiogênese terapêutica.

A partir dessas incertezas, a escolha pelo plasmídeo nu parece mais razoável para pacientes transplantados e imunossuprimidos, devido à boa tolerância, à baixa toxicidade e à imunogenicidade desprezível demonstrados nos protocolos já testados<sup>(85, 124-125)</sup>. Já a administração tópica na submucosa da via aérea é recomendada, pois eleva a concentração local do plasmídeo, produz ótimos níveis de retenção da dose aplicada e não compartilha com os efeitos adversos das infusões sistêmicas<sup>(114, 94, 105)</sup>.

### 1.7. Neovascularização

A neovascularização é um complexo mecanismo molecular que envolve uma combinação exclusiva de fatores de crescimento, sintetizados de forma coordenada e seqüencial, em quantidades e momento extremamente precisos. Além de ser indispensável para a cicatrização e regeneração teciduais, participa do crescimento somático, das modificações cíclicas do endométrio<sup>(79, 81, 89, 90)</sup> e de fenômenos patológicos como neoplasias malignas, artrite reumatóide e retinopatia proliferativa<sup>(79, 89, 90)</sup>.

De acordo com o período evolutivo do organismo e com as condições fisiopatológicas desencadeantes, a neovascularização se processa a partir da vasculogênese, da angiogênese ou da arteriogênese<sup>(126)</sup>.

Na fase embrionária, a vasculogênese é responsável pela formação (*de novo*) de uma rede capilar rudimentar a partir da diferenciação, *in situ*, de hemangioblastos em células endoteliais<sup>(79, 89)</sup>. Embora ocorra, predominantemente, na fase embrionária, a vasculogênese parece contribuir para uma parcela da neovascularização em organismos adultos, através de um mecanismo complexo que envolve a migração de células progenitoras endoteliais provenientes da medula

óssea<sup>(77, 87, 127-128)</sup>. Entre os fatores de crescimento que governam a vasculogênese estão o VEGF, o GM-CSF e o FGF<sup>(79, 89)</sup>.

Para que os tecidos embrionários em crescimento recebam uma perfusão condizente com suas necessidades metabólicas, os novos vasos precisam se multiplicar, incorporando pericitos e células musculares, a fim de originar uma rede capilar mais complexa<sup>(81, 87, 89, 127)</sup>. Essa nova estruturação vascular ocorre na fase da angiogênese, a partir de níveis progressivamente maiores de VEGF.

No adulto, a angiogênese promove o aparecimento da maioria dos novos vasos sanguíneos, através dos seguintes eventos seqüenciais, coordenados pelo VEGF com auxílio de outras moléculas (integrinas, angiotensinas, *Ephrin-B2*, NO, entre outras)<sup>(77, 87, 89, 95, 114, 126)</sup>.

- 1) vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e ativação endotelial nas vênulas pré-existentes;
- 2) ativação e liberação dos pericitos das paredes de capilares já existentes;
- 3) liberação de metaloproteinases e de plasminogênio com degradação da matriz extracelular e da membrana basal pericapilar com extravasamento de proteínas plasmáticas;
- 4) proliferação, diferenciação e reorganização das células endoteliais;
- 5) migração e proliferação dos pericitos;
- 6) brotamento (*sprouting*) e intossuscepção: alargamento e ramificação das vênulas através do aparecimento de pilares de células periendoteliais;
- 7) migração dos túbulos endoteliais sólidos através de uma fenda na parede vascular e na matriz extracelular, em direção ao estímulo angiogênico;
- 8) formação de uma luz nestes túbulos endoteliais com o aparecimento de fluxo sanguíneo;
- 9) organização dos pericitos ao redor do túbulo endotelial com início da diferenciação venosa ou arterial;

- 10) mudanças na matriz extracelular com desenvolvimento de uma nova lâmina basal;
- 11) formação de curvas nos túbulos endoteliais, unindo-se aos outros brotos capilares;
- 12) remodelamento vascular: involuções (*pruning*) e diferenciações dos novos capilares pela ação tanto de fatores angiogênicos como de anti-angiogênicos;
- 13) organização em uma rede de capilares com aparecimento de vasos maiores (artérias de resistência e colaterais).

A angiogênese finaliza com a miogênese vascular. A parede dos novos vasos atinge o amadurecimento com o recrutamento de células murais de suporte (células musculares lisas e pericitos), enquanto a proliferação e a migração endoteliais são inibidas<sup>(79, 87, 89, 126)</sup>. O fenômeno de maturação encerra-se com a constituição de uma nova membrana basal<sup>(79-81, 90)</sup>.

Embora a nova rede vascular da angiogênese forneça nutrientes e oxigênio, torna-se insuficiente perante tecidos somáticos em crescimento com novas demandas metabólicas, e também naqueles submetidos à isquemia pela oclusão de uma artéria principal<sup>(114)</sup>. Desta maneira, torna-se fundamental o aparecimento de novas artérias colaterais surgidas *de novo*, ou a partir da expansão e do remodelamento dos vasos de resistência já existentes; fenômeno este chamado de arteriogênese, que se desenrola fora da região isquêmica<sup>(114, 126)</sup>.

Na arteriogênese, portanto, começa uma nova muscularização vascular com desenvolvimento das camadas média e adventícia, originando novos vasos colaterais com capacidade de aumentar a perfusão tecidual, devido ao aumento do diâmetro da luz, às propriedades vasomotoras e elásticas adicionais, e, em alguns casos, à especialização endotelial órgão-dependente<sup>(89, 126-127, 129)</sup>. Logo, a recém surgida rede vascular colateral faz a ligação entre os capilares da região isquêmica com o segmento de um vaso de condutância, na região mais sadia do tecido<sup>(114)</sup>. Porém, todo o fenômeno de arteriogênese, para se completar, leva semanas ou



meses e, mesmo atingindo sua expansão máxima, a rede de vasos colaterais dificilmente substituirá por completo um vaso de condutância principal<sup>(114)</sup>.

### *1.8. Controle Molecular e Hemodinâmico da Neovascularização*

Indícios de um controle molecular da neovascularização surgiram, há 80 anos, pelos estudos de Krogh, que abordavam consumo metabólico e densidade capilar<sup>(130)</sup>. A neovascularização recebe um controle molecular órgão-específico que se processa pelo balanço entre as citocinas secretadas do endotélio, das células musculares lisas da parede vascular, do parênquima e daquelas armazenadas na matriz extracelular, constituindo-se numa resposta integrada frente às alterações hemodinâmicas, isquêmicas e inflamatórias<sup>(79, 87, 89)</sup>. Logo, as etapas da neovascularização são definidas pela relação entre citocinas estimuladoras (NO, VEGF, FGF, Ang1, Ang2, entre outros) e inibidoras (angiostatina, endostatina, antitrombina III, por exemplo)<sup>(81, 89, 94)</sup>; e o VEGF exerce a função central em todo esse fenômeno<sup>(129)</sup>.

Enquanto a inflamação e os fatores hemodinâmicos estariam mais relacionados à indução da arteriogênese<sup>(127)</sup>, sugere-se que a isquemia seria o principal “gatilho” da angiogênese por intermédio do HIF-1 $\alpha$ <sup>(77, 87, 94, 127)</sup>. O HIF-1 $\alpha$  é um fator de transcrição, expresso nos tecidos perivasculares, que sofre proteólise contínua na presença da homeostasia normal; todavia, se acumula em situações de hipóxia, o que facilita sua ligação a sítios promotores específicos (HRE), em mais de 40 genes angiogênicos, inclusive do VEGF-A. Por conseguinte, o HIF-1 $\alpha$  se configura no principal sistema molecular de resposta fisiológica à redução do PO<sub>2</sub> tecidual<sup>(77, 129, 127)</sup>.

Aliás, em relação ao VEGF, o efeito da isquemia não se restringe ao aumento da transcrição do gene, mas também reflete-se na maior estabilidade do RNAm, na mais longa permanência deste no sítio ribossomal e na elevação da

densidade de receptores VEGFRs, culminando na amplificação dos efeitos parácrinos do VEGF<sup>(131)</sup>.

Entretanto, a neovascularização iniciada pelos efeitos locais da isquemia, que se resume na proliferação de capilares e de pequenos vasos de resistência, exigiria um alto consumo de energia e um número muito grande de microvasos para compensar a oclusão de uma artéria de condutância<sup>(129)</sup>. Por isso, a neovascularização de um tecido isquêmico cursa pelo estabelecimento de uma rede de vasos capilares sempre associada à arteriogênese, o que garante o aumento significativo do fluxo sanguíneo.

Essa integração de angiogênese e arteriogênese se faz através de alterações hemodinâmicas. A redução de resistência vascular na região isquêmica, desde o surgimento da nova rede capilar, provoca a elevação da velocidade de fluxo sanguíneo e da pressão hidrostática nos pequenos vasos colaterais, constituindo as forças de *shear stress* que desencadeiam a arteriogênese<sup>(87, 114, 129)</sup>. A expansão dos vasos colaterais passa pela ativação endotelial, que se efetua a partir da captação das forças de *shear stress* pelos mecanorreceptores. Com o endotélio ativado, há a expressão de moléculas de adesão e fatores de crescimento (VEGF, MCP-1, TNF) que, entre outros efeitos, atraem monócitos, que são células fundamentais para a muscularização e o aumento das dimensões das artérias colaterais<sup>(87, 105, 114, 129)</sup>.

### 1.9. Angiogênese Molecular Terapêutica

A angiogênese terapêutica molecular, proposta inicialmente por Höckel, em 1993<sup>(132)</sup>, tem como princípio básico a indução de novos vasos, no tecido isquêmico, através da amplificação da angiogênese fisiológica que, outrora com escassez de fatores de crescimento endógenos, passa a contar com níveis suprafisiológicos de um ou de várias moléculas angiogênicas capazes de proporcionar o retorno da função orgânica, a partir da manutenção da viabilidade tecidual e a aceleração do

processo cicatricial. Ademais, essa estimulação angiogênica deve sobrepujar fatores limitantes, como idade avançada, diabetes e altos níveis de colesterol<sup>(77, 114)</sup>.

Com a evolução dos experimentos, Schaper e Scholz<sup>(133)</sup> afirmaram que os métodos de amplificação da angiogênese fisiológica devem também focar o crescimento de vasos arteriais colaterais como parte de uma adaptação para o salvamento de um órgão ou tecido após a parada do fluxo arterial. Para isso, se dispõe de duas opções terapêuticas distintas: 1) a formação *de novo* de novas arteríolas colaterais (angiogênese terapêutica) e 2) o remodelamento e a expansão de arteríolas pré-existentes e neoformadas, resultando no surgimento de novas artérias colaterais maiores e de artérias de condutância (arteriogênese terapêutica).

Neste sentido, a angiogênese terapêutica de uma região isquêmica com obstrução de vários pequenos vasos de condutância garantiria o fornecimento de nutrientes e O<sub>2</sub>, de forma transitória, até a recanalização das artérias maiores<sup>(129, 134)</sup>. Por outro lado, em extensas áreas de tecido hipoperfundido pela oclusão de uma artéria de condutância principal (uma artéria coronária, por exemplo), a melhor alternativa recai na arteriogênese terapêutica, aplicada em locais mais afastados do tecido isquêmico, de forma isolada ou complementar à angiogênese terapêutica<sup>(134)</sup>.

Cao et al.<sup>(77)</sup> acrescenta os seguintes pré-requisitos para o sucesso da neovascularização terapêutica: 1) os novos vasos devem ser funcionais e suprir a região isquêmica com sangue oxigenado; 2) esses vasos não devem regredir; 3) todo o processo deve ser rigorosamente regulado para se chegar à máxima eficiência.

Tentativas de estimular a proliferação vascular com proteínas vasoativas iniciaram, em 1991, com a heparina<sup>(135)</sup>. Todavia, nos últimos 10 anos, o VEGF foi a molécula angiogênica mais utilizada. Isto deveu-se à comprovação experimental de sua capacidade em revascularizar tecidos isquêmicos (miocárdio e membro inferior, principalmente) com a elevação do fluxo sanguíneo tecidual a partir da duplicação

do número e expansão do diâmetro de arteríolas pré-capilares e colaterais<sup>(85, 105, 115, 123, 134, 136)</sup>.

Os bons resultados, no entanto, estiveram na dependência da síntese sustentada do VEGF: a expressão mais prolongada (duas a quatro semanas) promoveria a integração definitiva dos pericitos à parede vascular, garantindo a expansão, a funcionalidade e a morfologia normais, além da permanência dos vasos recém formados<sup>(81, 98, 105, 114, 117, 122, 127)</sup>. Já a expressão por um período mais curto resultaria em edema e em vasos dismórficos e instáveis, que tenderiam à regressão após o término do estímulo angiogênico<sup>(81, 105)</sup>.

Neste sentido, os benefícios marginais encontrados com o uso do rhVEGF165 em 178 pacientes cardiopatas isquêmicos, durante um grande ensaio clínico<sup>(137)</sup>, são explicados pela meia-vida de apenas 30-45 min da proteína recombinante, ou seja, insuficiente para garantir uma nova rede vascular. Conclui-se que, a partir dos resultados com rhVEGF, haveria a necessidade da administração diária para se buscar um maior impacto clínico, limitação que estimulou trabalhos de terapia gênica com phVEGF<sup>(86, 127)</sup>.

A confirmação experimental de Tsurumi et al.<sup>(122)</sup> e de Takeshita et al.<sup>(138)</sup>, de que a expressão do VEGF, após a transferência do plasmídio nu (phVEGF 165), permanecia detectável até o 28º dia, associado aos resultados consistentes que indicavam aumento do fluxo sanguíneo colateral, estabeleceram os fundamentos para a realização dos trabalhos clínicos.

O primeiro relato clínico de revascularização com terapia gênica, através da aplicação de 2000 µg IM de phVEGF 165 nu, foi realizada por Isner et al.<sup>(124)</sup>, em 1996, numa paciente com isquemia de membro inferior. Logo, seguiram-se ensaios clínicos com plasmídio nu<sup>(125, 139)</sup>, ou com um vetor viral e lipossômico<sup>(140-141)</sup>, empregando 500 µg a 4000 µg de phVEGF (através de cateterismo para o miocárdio ou IM nos casos de isquemia de membro inferior), envolvendo um total de 229 pacientes. Apesar dos discretos benefícios clínicos (melhor contratilidade do

miocárdio, cura de úlceras isquêmicas e cancelamento de amputação), no seguimento de três a seis meses, esses quatro trabalhos confirmaram, clinicamente, a capacidade do phVEGF 165 em aumentar a perfusão de tecidos isquêmicos, a partir da proliferação e elevação da condutância dos vasos colaterais e do aumento da densidade de capilares, conforme sustentam os estudos clínicos<sup>(125, 140)</sup> e experimentais mais recentes<sup>(142, 117)</sup>.

O número ainda reduzido de pacientes arrolados, a idade avançada (menos responsivos aos estímulos angiogênicos), a presença de fatores inibidores da neovascularização como aterosclerose, e o uso simultâneo de drogas com efeito negativo sobre a angiogênese (bloqueadores dos receptores de angiotensina, por exemplo) podem explicar, pelo menos em parte, a falta de benefícios mais contundentes com a aplicação do phVEGF 165<sup>(81, 87, 96, 127, 134)</sup>.

Simultaneamente, os diversos estudos experimentais e clínicos apontaram alguns possíveis efeitos adversos associados ao VEGF, destacando-se o crescimento de tumores (hemangiomas, por exemplo), fragilidade capilar, instabilização de placas de ateroma, edema da região transfectada e hipotensão<sup>(77, 87, 92, 103-105, 117, 127, 142)</sup>. Em compensação, essas complicações foram infreqüentes, transitórias e de pouca intensidade, de acordo com estudos mais recentes<sup>(87, 141, 143)</sup>.

Adicionalmente aos protocolos de terapia gênica, surgiram métodos alternativos de revascularização terapêutica como a aplicação simultânea de várias moléculas angiogênicas<sup>(144, 87)</sup>, o emprego de polímeros de liberação lenta<sup>(127)</sup> e as terapias celulares<sup>(145)</sup>. Entretanto, até o momento, essas novas ferramentas não apresentam definições consistentes em relação à eficácia e ao seu lugar na gama de situações patológicas passíveis de angiogênese.

Apesar dos muitos trabalhos indexados mensalmente esclarecerem os mecanismos moleculares da angiogênese, dúvidas de qual o melhor protocolo de terapia gênica para promover a angiogênese terapêutica do brônquio e, com isso,

reduzir o tempo de isquemia do pulmão transplantado inspiraram o desenvolvimento do presente estudo.

#### *1.10. Bibliografia*

1. Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, Boucek MM, Berkeley MK, Hertz ML. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult lung and Heart-Lung transplant report – 2005. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:956-67.

2. U.S. Department of Health and Human Services. 2005 Annual Report of the U.S. Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients: Transplant Data 1995-2004. <http://www.optn.org/AR2005> (14 Jun 2006).

3. Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ayabe H, Ferdman A, Cooper JD. Improved bronchial healing in canine left lung reimplantation using omental pedicle wrap. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;85:134-9.

4. Lima O, Goldberg M, Peters WJ, Ayabe H, Townsend E, Cooper JD. Bronchial omentopexy in canine lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;83:418-21.

5. Patterson GA. Airway revascularization: is it necessary? *Ann Thorac Surg* 1993;56:807-8.

6. Baudet EM, Dromer C, Dubrez J, Jougon JB, Roques X, Velly JF, et al. Intermediate-term results after en bloc double-lung transplantation with bronchial revascularization. Bordeaux lung and Heart-Lung Transplant Group *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:1292-300.

7. Patterson GA, Cooper JD. Status of lung transplantation. *Surg Clin N Am* 1988;68:545-58.

8. Trulock EP. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:789-818.
9. Nowak K, Kamler M, Bock M, Motsch J, Hagl S, Jakob H, et al. Bronchial artery revascularization affects graft recovery after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:216-20.
10. Demijov VP. *Transplante experimental de organos vitales*. 1<sup>st</sup> Edition, Madrid: Editorial Atlante; 1967.
11. Metras H. Note preliminaire sur la greffe totale du poumon chez le chien. *C R Acad Sci* 1950;231:1176-8.
12. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Walker GR. Lung homotransplantations in man. *JAMA* 1963;186:1065-74.
13. Vigneswaran WT, Sakiyalak P, Bhorade S, Bakhos M. Airway complications after isolated lung transplantation. *Transpl Rev* 2002;16:87-94.
14. Singer LG, Weinacker AB, Theodore J. Long-term management and outcome of heart-lung and lung transplant recipients. In: Baumgartner WA, Reitz B, Kasper E, Theodore J. (Ed) *Heart and Lung Transplantation*. 2<sup>nd</sup> Edition, Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2002.
15. Wildevuur CRH, Benfield JR. A review of 23 human lung transplantations by 20 surgeons. *Ann Thorac Surg* 1970;9:489-515.
16. Veith FJ, Kamholz SL, Mollenkopf FP, Montefusco CM. Lung transplantation 1983. *Transplantation* 1983;35:271-8.
17. Cooper JD. Lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1989;47:28-44.
18. Jeppsson A, Lee R, Pellegrini C, O'Brien T, Tazelaar H, McGregor CGA. Gene therapy in lung transplantation: effective gene transfer via the airways. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:638-43.
19. Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, Pennock JL, Billingham ME, Oyer PE, et al. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med* 1982;306:557-64.

20. Shennib H, Massard G. Airway complications in lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1994;57:506-11.
21. Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ferman A, Luk, SK, Cooper JD. Successful revascularization of totally ischemic bronchial autografts with omental pedicle flaps in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;84:204-10.
22. Cooper JD, Patterson GA, Grossman R, Maurer J. Double-lung transplant for advanced chronic obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:303-7.
23. Patterson GA, Cooper JD, Dark JH, Jones MT. Experimental and clinical double lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988;95:70-75.
24. Cooper JD, Pearson FG, Patterson GA, Todd TR, Ginsberg RJ, Goldberg M, et al. Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93:173-81.
25. Patterson GA, Todd TR, Cooper JD, Pearson FG, Winton TL, Maurer J. Airway complications after double lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;99:14-21.
26. Noirclerc MJ, Metras D, Vaillant A, Dumon JF, Zimmermann JM, Caamano A, et al. Bilateral bronchial anastomosis in double lung and heart-lung transplantations. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1990;4:314-7.
27. Pasque MK, Cooper JD, Kaiser LR, Haydock DA, Triantafillou A, Trulock EP. Improved technique for bilateral lung transplantation: rationale and initial clinical experience. *Ann Thorac Surg* 1990;49:785-91.
28. Miller JD, DeHoyos A. An evaluation of the role of omentopexy and of early perioperative corticosteroids administration in clinical lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:247-52.
29. Date H, Trulock EP, Arcidi JM, Sundaresan S, Cooper JD, Patterson GA.. Improved airway healing after lung transplantation. An analysis of 348 bronchial anastomoses. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1424-32.



30. Colquhoun IW, Gascoigne AD, Au J, Corris PA, Hilton CJ, Dark JH. Airway complications after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg* 1994;57:141-5.
31. Kshetry VR, Kroshus TJ, Hertz MI, Hunter DW, Shumway SJ, Bolman RM 3rd. Early and late airway complications after lung transplantation: incidence and management. *Ann Thoracic Surg* 1997;63:1576-83.
32. Sundset A, Tadjkarimi S, Khaghani A, Kvernebo K, Yacoub MH. Human en bloc double-lung transplantation: bronchial artery revascularization improves airway perfusion. *Ann Thorac Surg* 1997;63:790-5.
33. Haydock DA, Trulock EP, Kaiser LR, Ettinger NA, Triantifillou AN, Ochoa LL, et al. Lung transplantation. Analysis of thirty-six consecutive procedures performed over a twelve-month period. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;103:329-40.
34. Herold U, Jakob H, Kamler M, Thiele R, Tochtermann U, Weinmann J, et al. Interruption of bronchial circulation leads to a severe decrease in peribronchial oxygen tension in standard lung transplantation technique. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1998;13:176-83.
35. Deffebach ME, Charan NB, Lakshminarayan S, Butler J. The bronchial circulation. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:463-81.
36. Deal CW, Louis E, Kerth WJ, Osborn JJ, Gerbode FG. Bronchopulmonary precapillary blood flow during cardio-pulmonary bypass. *Am Heart J* 1968;75:43-8.
37. Nørgaard MA, Olsen PS, Svendsen UG, Pettersson G. Revascularization of the bronchial arteries in lung transplantation: an overview. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1215-21.
38. Barman SA, Ardell JI, Parker JC, Perry ML, Taylor AE. Pulmonary and systemic blood flow contributions to upper airways in canine lung. *Am J Physiol* 1988;255:H1130-5.

39. Bernard SL, Glenny RW, Polissar NL, Luchtel DL, Lakshminarayan S. Distribution of pulmonary and bronchial blood supply to airways measured by fluorescent microspheres. *J Appl Physiol* 1996;80:430-6.
40. Mills NL, Boyd AD, Gheranponmg C. The significance of bronchial circulation in lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1970;60:866-78.
41. Macedo A, Fadel E, Mazmanian GM, de Montpreville V, German-Fattal M, Mussot S, et al. Heterotopic en bloc tracheobronchial transplantation with direct revascularization in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:1593-601.
42. Pearson FC, Goldberg M, Stone RM, Colapinto RF. Bronchial arterial circulation restored after reimplantation of canine lung. *Can J Surg* 1970;13:243-50.
43. Juvenelle A, Citret C, Wiles CE, Stewart JD. Pneumonectomy with replantation of the lung in the dog for physiologic study. *J Thor Surg* 1951;21:111-4.
44. Rabinovich JJ. Re-establishment of bronchial arteries after experimental lung lobe autotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1972;64:119-26.
45. Andrews MJ & Pearson FG. Relation of bronchial arterial circulation, and other factors, to the transient defect in oxygen uptake following autotransplantation of the canine lung. *Can J Surg* 1973;16:97-109.
46. Siegelman SS, Hagstrom JWC, Koerner SK, Veith FJ. Restoration of bronchial artery circulation after canine lung allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977;73:792-5.
47. Lima O, Cooper JD, Peters WJ, Ayabe H, Townsend E, Luk SC, et al. Effects of methylprednisolone and azathioprine on bronchial healing following lung autotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981;82:211-5.
48. Goldberg M, Lima O, Morgan E, Ayabe HA, Luk S, Ferdman A, et al. Comparison between cyclosporin A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung autotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;85:821-6.

49. Fujino S, Inoue S, Yamashita N, Mori A. An experimental study on direct revascularization of bronchial circulation by microvascular anastomosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:1067-74.

50. Turrentine MW, Kesler KA, Wright CD, McEwen KE, Faught PR, Miller ME, et al. Effect of omental, intercostals, and internal mammary artery pedicle wraps on bronchial healing. *Ann Thorac Surg* 1990;49:574-9.

51. Bando K, Paradis IL, Similo S, Konishi I, Komatsu K, Zullo TG, et al. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. An analysis of risk factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:4-14.

52. Read RC, Shankar S, Rutman A, Feldman C, Yacoub M, Cole PJ, et al. Ciliary beat frequency and structure of recipient and donor epithelia following lung transplantation. *Eur Respir J* 1991;4:796-801.

53. Norgaard MA, Andersen VB, Pettersson G. Airway epithelium of transplanted lungs with and without direct bronchial artery revascularization. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1999;15:37-44.

54. Krebs R, Tickanen JM, Nykänen AI, Wood J, Jeltsch M, Yla-Herttuala S, et al. Dual role of vascular endothelial growth factor in experimental obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1421-9.

55. Langenbach SY, Zheng L, McWilliams M, Levvey B, Orsida B, Bailey M, et al. Airway vascular changes after lung transplant: potential contribution to the pathophysiology of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1550-6.

56. Yacoub M, Al-Kattan KM, Tadjkarimi S, Eren T, Khaghani A. Medium term results of direct bronchial arterial revascularisation using IMA for single lung transplantation (SLT with direct revascularisation). *Eur J Cardio-thorac Surg* 1997;11:1030-6.

57. Zheng L, Orsida BE, Imm GD, Ward C, Wilson JW, Williams TJ, et al. Airway vascular changes in lung allograft recipients. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:231-8.
58. Pettersson G, Nørgaard M, Arendrup H, Arendrup H, Brandenhof P, Helvind M, et al. Direct bronchial artery revascularization an en-bloc double lung transplantation: surgical techniques and early outcome. *J Heart Lung Transplant* 1997;16:320-33.
59. Nørgaard MA, Efsen F, Andersen CB, Svendsen UG, Pettersson G. Medium-term patency and anatomic changes after direct bronchial artery revascularization in lung and heart-lung transplantation with the internal thoracic artery conduit. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:326-31.
60. Morrison R. Remarks on some functions of the omentum. *Br Med J* 1906;1:76-9.
61. Griffith BP, Magee MJ, Gonzalez IF, Houel R, Armitage JM, Hardesty RL, et al. Anastomotic pitfalls in lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:743-54.
62. Couraud L, Nashef SAM, Nicolini Ph, Jougon J. Classification of airway anastomotic healing. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1992;6:496-7.
63. Calhoun JH, Grover FL, Gibbons WJ, Bryan CL, Levine SM, Bailey SR, et al. Single lung transplantation: alternative indications and technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;101:816-25.
64. Schafers HJ, Haydock DA, Cooper JD. The prevalence and management of bronchial anastomotic complications in lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;101:1044-52.
65. Giudicelli R, Thomas P, Massard G, Reynaud M, Fuentes P, Noirclerc M, and the Joint Marseille-Montréal Lung Transplant Program. Tracheobronchial healing after lung and heart-lung transplantation. A critical review of 64 anastomoses. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1993;7:453-6.

66. Auteri JS, Jeevanandam V, Sanchez JA, Marboe CC, Kirby TJ, Smith CR. Normal bronchial healing without bronchial wrapping in canine lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1992;53:80-4.

67. Khaghani A, Tadjkarimi S, Al-Kattan K, Banner N, Daly R, Theodoropoulos S, et al. Wrapping the anastomosis with omentum or an internal mammary artery pedicle does not improve bronchial healing after single lung transplantation: results of a randomized clinical trial. *J Heart Lung Transplant* 1994;13:767-73.

68. Couraud L, Baudet E, Martigne C, Roques X, Velly JF, Laborde N, et al. Bronchial revascularization in double-lung transplantation: series of 8 patients. Bordeaux Lung and Heart-Lung Transplantant Group. *Ann Thorac Surg* 1992;53:88-94.

69. Daly RC, McGregor CGA. Routine immediate direct bronchial artery revascularization for single-lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1994;57:446-52.

70. Tagawa T, Suda T, Daddi N, Kozower BD, Kanaan SA, Mohanakumar T, et al. Low-dose endobronchial gene transfer to ameliorate lung graft ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:795-802.

71. Itano H, Mora BN, Zhang W, Ritter JH, McCarthy TJ, Yew NS, et al. Lipid-mediated ex vivo gene transfer of viral interleukin 10 in rat lung allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122: 29-38.

72. Sung SW, Won T. Effects of basic fibroblast growth factor on early revascularization and epithelial regeneration in rabbit tracheal orthotopic transplantation. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2001;19:14-8.

73. Mayer E, Cardoso PF, Puskas JD, De Campos K, Oka T, Dardick I, et al. The effect of basic fibroblast growth factor and omentopexy on revascularization and epithelial regeneration of heterotopic rat tracheal isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:180-8.

74. Cassivi SD, Cardella JA, Fisher S, Liu M, Slutsky AS, Keshavjee S, et al. Transtracheal gene transfection of donor lungs prior to organ procurement increases transgene levels at reperfusion and following transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:1181-8.
75. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133:275-88.
76. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-5.
77. Cao Y, Hong A, Schulten H, Post MJ. Update on therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Res* 2005;65:639-48.
78. Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003;9:694-701.
79. Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart J* 2003;24:586-603.
80. Visconti RP, Richardson CD, Sato TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8219-24.
81. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000 407;242-8.
82. Claffey KP, Senger DR, Spiegelman BM. Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochim Biophys Acta* 1995;1246:1-9.
83. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, M Silva, D Gospodarowicz, JC Fiddes, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1991;266:11947-54.

84. Vicenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-5.

85. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994;89:2183-9.

86. Olech VM, Keshavjee H, Chamberlain W, Slutsky AS, Patterson GA. Role of basic fibroblast growth factor in revascularization of rabbit tracheal autografts. *Ann Thorac Surg* 1991;52:258-64.

87. Collinson DJ, Donnelly R. Therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease: can biotechnology produce an effective collateral circulation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;28:9-23.

88. Pagès G, Pouysségur J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene – a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* 2005;65:564-73.

89. Carmeliet P. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.

90. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18-32.

91. Lizuka M, Yamauchi M, Ando K, Hori N, Furusawa Y, Itsukaichi H, et al. Quantitative RT-PCR assay detecting the transcriptional induction of vascular endothelial growth factor under hypoxia. *Biochem Biophys Res Comm* 1994;205:1474-80.

92. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005;65:550-63.

93. Couffinhal T, Kearney M, Witzgenbichler B, Chen Dongfen, Murohara T, Losordo DW, et al. Vascular endothelial growth factor;vascular permeability factor

(VEGF;VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol* 1997;150:1673-85.

94. Melillo G, Scocciati M, Kovesdi I, Safi Jr. J, Riccioni T, Capogrossi MC. Gene therapy for collateral vessel development. *Cardiovasc Res* 1997;35:480-9.

95. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H. Angiogenesis: an update. *Histol Histopath* 1994;9:807-43.

96. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, et al. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 2003;92:1098-106.

97. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.

98. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003;9:669-76

99. Koransky ML, Robbins RC, Blau HM. VEGF gene delivery for treatment of ischemic cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:108-14.

100. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-9.

101. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;439-42.

102. Dulak J, Józkomicz F. Nitric oxide and angiogenic activity of endothelial cells: direct or VEGF-dependent effect? *Cardiovasc Res* 2002;56:487-8.

103. Celec P, Yonemitsu Y. Vascular endothelial growth factor – basic science and its clinical implications. *Pathophys* 2004;11:69-75.

104. Losordo DW, Isner JM. Vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis: crouching tiger or hidden dragon. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:2131-5.



105. Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, Baffour R, Kornowski R. Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc Res* 2001;49:532-42.
106. Tatum EL. Molecular biology, nucleic acids and the future of medicine. *Perspect Biol Med* 1966;10:19-32.
107. Anderson WF, Blaese RM, Culver K. The ADA human gene therapy protocol. *Hum Gene Ther* 1990;1:331-41.
108. Medline. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>. Accessed June 15, 2006.
109. Dharmarajan S, Hayama M, Kozlowski J, Ishiyama T, Okazaki M, Factor P, et al. In vivo molecular imaging characterizes pulmonary gene expression during experimental lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005;5:1216-25.
110. Suda T, D'Ovidio F, Daddi N, Ritter JH, Mohanakumar T, Patterson GA. Recipient intramuscular gene transfer of active transforming growth factor-beta1 attenuates acute lung rejection. *Ann Thorac Surg*. 2001;71:1651-6.
111. Daddi N, Kanaan SA, Suda T, Tagawa T, D'Ovidio F, Grapperhaus K, et al. Recipient intramuscular administration of naked plasmid TGF-beta1 attenuates lung graft reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant*. 2003;22:1323-34.
112. Fischer S, De Perrot M, Liu M, MacLean AA, Cardella JA, Imai Y, et al. Interleukin 10 gene transfection of donor lungs ameliorates posttransplant cell death by a switch from cellular necrosis to apoptosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126:1174-80.
113. Boehler A, Chamberlain D, Xing Z, Slutsky AS, Jordana M, Gauldie J, et al. Adenovirus-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits post-transplant fibrous airway obliteration in an animal model of bronchiolitis obliterans. *Hum Gene Ther* 1998;1:541-51.

114. Markkanen JE, Rissanen TT, Kivelä A, Ylä-Herttua S. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart-gene therapy. *Cardiovasc Res* 2005;65:656-64.

115. Takeshita S, Isshiki T, Mori H, Tanaka E, Tanaka A, Umetani K, et al. Microangiographic assessment of collateral vessel formation following direct gene transfer of vascular endothelial growth factor in rats. *Cardiovasc Res* 1997;35:547-52.

116. Lee R, Boasquevisque CHR, Boglione MM, Hiratsuka M, Scheule RK, Cooper JD, et al. Isolated lung liposome-mediated gene transfer produces organ-specific transgenic expression. *Ann Thorac Surg* 1998;66:903-7.

117. Yau TM, Li G, Zhang Y, Weisel RD, Mickle DAG, Li R-K. Vascular endothelial growth factor receptor upregulation in response to cell-based angiogenic gene therapy. *Ann Thorac Surg* 2005;79:2056-64.

118. Eisenstein R, Kuettner KE, Neapolitan C, Soble LW, Sorgente N. The resistance of certain tissues to invasion. III. Cartilage extracts inhibit the growth of fibroblasts and endothelial cells in culture. *Am J Pathol* 1975;81:337-47.

119. Lechardeur D, Verkman AS, Lukacs GL. Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:755-67.

120. Boasquevisque CHR, Lee TC, Mora BN, Peterson D, Osburn WO, Bernstein M, et al. Liposome-mediated gene transfer to lung isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:783-92.

121. Takeshita S, Weir L, Chen D, Zheng LP, Riessen R, Bauters C, et al. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:628-35.

122. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding VEGF augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996;94:3281-90.

123. Katsube K, Bishop AT, Simari RD, Ylä-Herttuala S, Friedrich PF. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfer enhances surgical revascularization of necrotic bone. *J Orthop Res* 2005;23:469-74.
124. Isner JM, Picczek A, Schainfeld R, Hakey L, Ashasra T, Rosenfield K. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996;348:370-4.
125. Baumgartner I, Picczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. Constitutive expression of phVEGF<sub>165</sub> after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998;97:1114-23.
126. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-93.
127. Muinck ED, Simons M. Re-evaluating therapeutic neovascularization. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:25-32.
128. Schneider M, Tjwa M, Carmeliet P. A surrogate marker to monitor angiogenesis at last. *Cancer Cell* 2005;7:3-4.
129. Van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hofer I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res* 2001;49:543-53.
130. Krogh A. The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J Physiol* 1919;52:409-15.
131. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9:677-84.
132. Höckel M, Schlenger K, Doctrow S, Kissel T, Vaupel P. Therapeutic angiogenesis. *Arch Surg* 1993;128:423-9.
133. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1143-51.

134. Simons M, Ware JA. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nature Reviews* 2003;2:1-9.

135. Unger EF, Sheffield CD, Epstein SE. Heparin promotes the formation of extracardiac to coronary anastomoses in a canine model. *Am J Physiol* 1991;260:H1625-34.

136. Romano Di Peppe S, Mangoni A, Zambruno G, Spinetti G, Melillo G, Napolitano M, et al. Adenovirus-mediated VEGF (165) gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice. *Gene Ther* 2002;9:1271-7.

137. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, et al. The VIVA trial: vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. *Circulation* 2003;107:1359-65.

138. Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl T, Asahara T, Bauters C, Symes J, et al. Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of VEGF stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest* 1996;75:487-501.

139. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Kristina Tägil, Dietmar Glogar, Witold Ruzyllo, et al. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A<sub>165</sub> gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:982-8.

140. Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, et al. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther* 2002;6:127-33.

141. Hedman M, Hartikainen J, Sylvanne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivela A, et al. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary VEGF gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of

chronic myocardial ischaemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis trial (KAT).  
Circulation 2003;107:2677-83.

142. Kondoh K, Koyama H, Miyata T, Takato Y, Hamada H, Shigematsu H.  
Conduction performance of collateral vessels induced by vascular endothelial growth  
factor or basic fibroblast growth factor. Cardiovasc Res 2004;61:132-42.

143. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin  
Oncol 2002;29:15-8.

144. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, et  
al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced  
postnatal neovascularization. Circ Res 1998;83:233-40.

145. Yau TM, Li G, Weisel RD, Reheman A, Jia Z-Q, Mickle DAG, et al.  
Vascular endothelial growth factor transgene expression in cll-transplanted hearts. J  
Thorac Cardiovasc Surg 2004;127:1180-7.

## RESUMO

**Objetivos:** avaliar a eficiência da transfecção do brônquio isquêmico com phVEGF 165 e investigar a presença de revascularização sistêmica, no brônquio isquêmico, após três dias da aplicação deste plasmídeo.

**Metodologia:** cães submetidos a broncotomia e dissecação circunferencial hilar foram distribuídos aleatoriamente para receber a aplicação de terapia gênica com 50 µg de phVEGF 165 (grupo VEGF, n = 9) ou de solução fisiológica 0,9% (grupo controle, n = 9) no brônquio isquêmico. Após três dias, em 10 animais sobreviventes, coletamos amostras do brônquio isquêmico para extração do RNAm total e nos outros 7 cães, injetamos corante microvascular na aorta canina. Analisamos, nos segmentos de brônquio isquêmico, a expressão gênica (RT-PCR) e a expressão protéica do VEGF (imunistoquímica anti-VEGF), além de verificar a presença de vasos da submucosa brônquica preenchidos com corante microvascular.

**Resultados:** o grupo VEGF apresentou 100% dos brônquios com vasos da submucosa brônquica preenchidos com corante microvascular, enquanto que, no grupo controle, não houve evidências de vasos corados. Também o grupo VEGF mostrou a expressão gênica ( $p = 0,000$ ) e protéica ( $p = 0,015$ ) mais intensa que o grupo controle.

**Conclusão:** o sucesso na transfecção do brônquio isquêmico com plasmídeo phVEGF 165 estimulou a revascularização sistêmica em três dias.

### Palavras-chave

angiogênese, terapia gênica, isquemia, revascularização, brônquio

### 3. INTRODUÇÃO

Os primeiros transplantes pulmonares, na década de 70, foram marcados pelas complicações isquêmicas desastrosas da anastomose brônquica<sup>(1-4)</sup>.

Apesar das dificuldades iniciais, os avanços técnicos alavancaram os transplantes como primeira opção de tratamento das doenças pulmonares terminais. Os novos métodos de preservação do pulmão e a imunossupressão mais efetiva e segura são apontados como responsáveis pela redução dos problemas na anastomose da via aérea, fruto da melhor conservação da microcirculação brônquica<sup>(5-6)</sup>. Ainda assim, observa-se uma prevalência de 7 % até 27,4 % de complicações isquêmicas da anastomose brônquica com a técnica convencional de transplantes, configurando-se um problema persistente<sup>(2, 7-8)</sup>.

Além de facilitar a cicatrização da via aérea transplantada, a circulação brônquica faz parte de um sistema complexo de proteção dos pulmões para as mais diversas agressões inflamatórias e infecciosas<sup>(9-10)</sup>. Apesar dos efeitos clínicos da interrupção das artérias brônquicas ainda serem pouco compreendidos, a literatura aponta para a possibilidade da interação de complicações infecciosas, inflamatórias e da própria BOS com a interrupção aguda da vascularização sistêmica brônquica<sup>(11-12)</sup>, implicando a modesta sobrevida de 63%/3 anos e 41% /5 anos dos transplantes pulmonares<sup>(13-14)</sup>.

O reconhecimento da importância da circulação arterial brônquica e a insatisfação com os resultados dos transplantes incentivaram a investigação de métodos de angiogênese terapêutica do brônquio doador a fim de restabelecer, precocemente, a circulação sistêmica pulmonar, buscando a redução das complicações pós-transplante. Entre os métodos desenvolvidos, destacaram-se as técnicas de revascularização direta<sup>(15-16)</sup>; porém, a maioria dos centros transplantadores não aplica métodos de revascularização, pois aguardam estudos

clínicos randomizados que legitimem o tempo transoperatório consumido com a realização de tais técnicas<sup>(9, 17)</sup>.

Com o progresso da biologia molecular, surgiram novas ferramentas como a terapia gênica para promover a revascularização de tecidos isquêmicos<sup>(18-19)</sup>; essa estratégia consiste na inserção do cDNA codificador de uma proteína terapêutica nas células do tecido isquêmico.

O VEGF 165 é a isoforma do fator de crescimento vascular endotelial que vem se destacando pela maior capacidade de estimular a proliferação vascular (angiogênese)<sup>(20-21)</sup> e o desenvolvimento de vasos colaterais (arteriogênese)<sup>(22-23)</sup>, assim como pela excelente biodisponibilidade e marcado efeito parácrino<sup>(24)</sup>. Estudos experimentais<sup>(22-23, 25-26)</sup> e clínicos<sup>(27-28)</sup> que empregaram plasmídeo com phVEGF 165 já mostraram resultados promissores na revascularização do miocárdio e do membro inferior isquêmicos.

A fim de reduzir o tempo de isquemia de um pulmão transplantado e diminuir a incidência de complicações da sua anastomose brônquica, investigamos um método inédito e, ao mesmo tempo, simples de angiogênese terapêutica molecular para a via aérea isquêmica, que possibilitasse o retorno precoce da circulação arterial brônquica. Assim, o plasmídeo phVEGF 165 nu foi aplicado, no brônquio isquêmico canino, para que, através da sua expressão gênica e protéica, estimulasse a angiogênese e sinais de revascularização sistêmica, nesta via aérea, em três dias.



## **4. OBJETIVOS**

### *4.1. Objetivo Geral*

Estimular a angiogênese através da terapia gênica com VEGF a fim de permitir o retorno mais precoce da circulação arterial sistêmica em uma via aérea isquêmica.

### *4.2. Objetivos Específicos*

4.2.1. Analisar a capacidade de transfecção do plasmídio nu phVEGF 165, no brônquio isquêmico.

4.2.2. Avaliar a elevação do VEGF, ao nível protéico, após a transfecção do brônquio isquêmico com o phVEGF 165.

4.2.3. Verificar sinais de revascularização arterial sistêmica, na submucosa do brônquio isquêmico, após três dias da transfecção com phVEGF 165.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho experimental, randomizado, cego e controlado foi desenvolvido no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelos seguintes laboratórios: Unidade de Experimentação Animal, Centro de Terapia Gênica e Laboratório de Vias Aéreas e Pulmão.

A amostra da pesquisa constituiu-se de cães adultos, sem raça definida e de ambos os sexos, pesando entre 7 Kg a 12 Kg, submetidos a uma quarentena prévia de sete dias, com adequado controle sanitário e exames clínico e laboratorial (hemograma, potássio, sódio e magnésio) normais. O canil do Centro de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Porto Alegre forneceu todos os cães do experimento.

Os animais foram, então, distribuídos em dois grupos experimentais: o grupo VEGF (n = 10) com terapia gênica, e o grupo controle (n = 9), que recebeu solução fisiológica a 0,9%.

Durante o período de três dias do pós-operatório, os animais foram mantidos em instalações adequadas, recebendo ração comercial balanceada e água potável *ad libitum*. A manipulação e o alojamento dos cães estiveram de acordo com a Resolução Normativa No. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do *US National Institute of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996)*. O estudo também recebeu aprovação e supervisão do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, credenciado ao *Office for Human Research Protection (OHRP)* dos EUA.

No 3º pós-operatório, os cães sobreviventes foram submetidos à eutanásia com a droga T-61® IV (embutramida, mebenzônio iodado e tetracaína)<sup>(29)</sup> (Intervet, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 0,3 mL/Kg. Nos 10 primeiros cães (cinco de cada grupo), foi avaliada, unicamente, a expressão gênica do VEGF no brônquio isquêmico. No restante dos animais, realizaram-se as análises histológica, microvascular e imunoistoquímica do brônquio.

### *5.1. Anestesia*

Os cães estavam em jejum alimentar de 8 h e hídrico de 4 h, quando foram pré-medicados com sulfato de atropina SC (0,04 mg/Kg) e acepromazina IM (0,2 mg/Kg). Após 15 min, a indução anestésica dos animais foi iniciada com tiopental sódico IV (15 mg/Kg), atracúrio IV (0,4 mg/kg) e pré-oxigenação com O<sub>2</sub> a 100%. Realizou-se a intubação com tubo traqueal 7 mm (Rüschelit<sup>®</sup>, Rüsch, Montevideo, Uruguai), e a anestesia foi mantida com isoflurano IN (0,5 % a 1,3%). Durante a indução anestésica, procedia-se à profilaxia antibiótica com cefazolina IV (15mg/Kg).

O respirador mecânico (BIRD<sup>®</sup> Mark 7, Bird, Palm Spring, CA, USA) era ajustado com os seguintes parâmetros: VAC = 15 mL/Kg, FR 20 mpm e relação inspiração:expiração 1:2. Durante o procedimento cirúrgico, o cão foi monitorado com eletrocardiograma, oximetria de pulso, pressão arterial média e ventilometria (Ventcare<sup>®</sup>, K. Takaoka, São Paulo, SP, Brasil).

### *5.2. Procedimento cirúrgico*

Depois da toracotomia póstero-lateral no quinto espaço intercostal esquerdo, o ligamento pulmonar era liberado e abria-se o pericárdio anterior em toda a sua extensão. A seguir, a artéria pulmonar esquerda era dissecada até a origem do seu primeiro ramo lobar e o lobo inferior era tracionado cranialmente a fim de permitir a dissecção do plano anatômico avascular entre o brônquio principal e o átrio esquerdo (fig. 1). Com o brônquio afastado do átrio esquerdo, o brônquio principal foi exposto da carina à origem do brônquio lobar superior. Após a colocação de um clampe justa-carinal, procedia-se à broncotomia do brônquio principal, seccionando-o, transversalmente, a dois anéis cartilagosos proximal da emergência dos brônquios lobares. A hemostasia dos ramos da artéria brônquica esquerda foi meticulosamente realizada com eletrocautério, mas sem a remoção da rede vascular

peribrônquica. Finalmente, completou-se a dissecação circunferencial hilar, através da secção do pericárdio posterior longitudinalmente (fig. 1). Neste momento, o phVEGF 165 nu ou a solução fisiológica a 0,9 % era injetado no coto distal do brônquio (fig. 2).

Para a reconstrução do brônquio principal, a anastomose brônquica era efetuada mediante uma sutura término-terminal em chuleio simples e contínuo, empregando fio polipropileno 4-0 (Prolene<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) (fig.1). A seguir, a carina traqueal era desclampeada e posicionava-se um dreno de tórax 14 F (P. Simons, São Paulo, SP, Brasil). Após o fechamento da toracotomia com fio poliglactina 0 (Vicryl<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) e sutura da pele com nylon 3-0 (Mononylon<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), esse dreno era retirado.

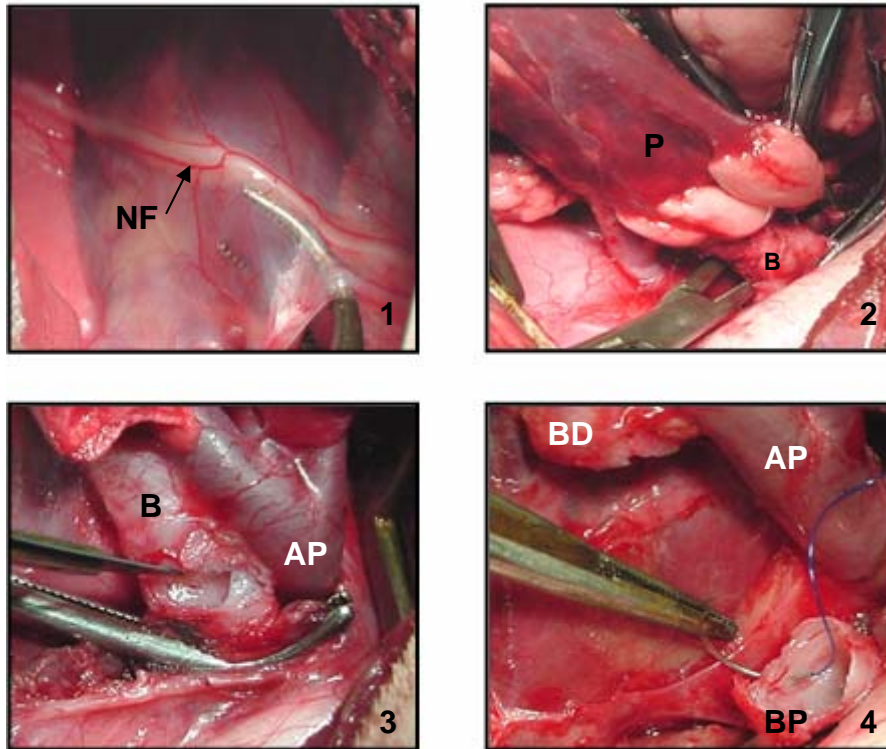


Fig. 1. Dissecção hilar e broncotomia. Foto 1: abertura do pericárdio anterior logo abaixo do nervo frênico. Foto 2: dissecção do brônquio principal esquerdo. Foto 3: broncotomia. Foto 4: broncorrafia. Artéria pulmonar (AP), brônquio distal isquêmico (BD), brônquio esquerdo (B), brônquio proximal (BP), nervo frênico (NF), pulmão (P).

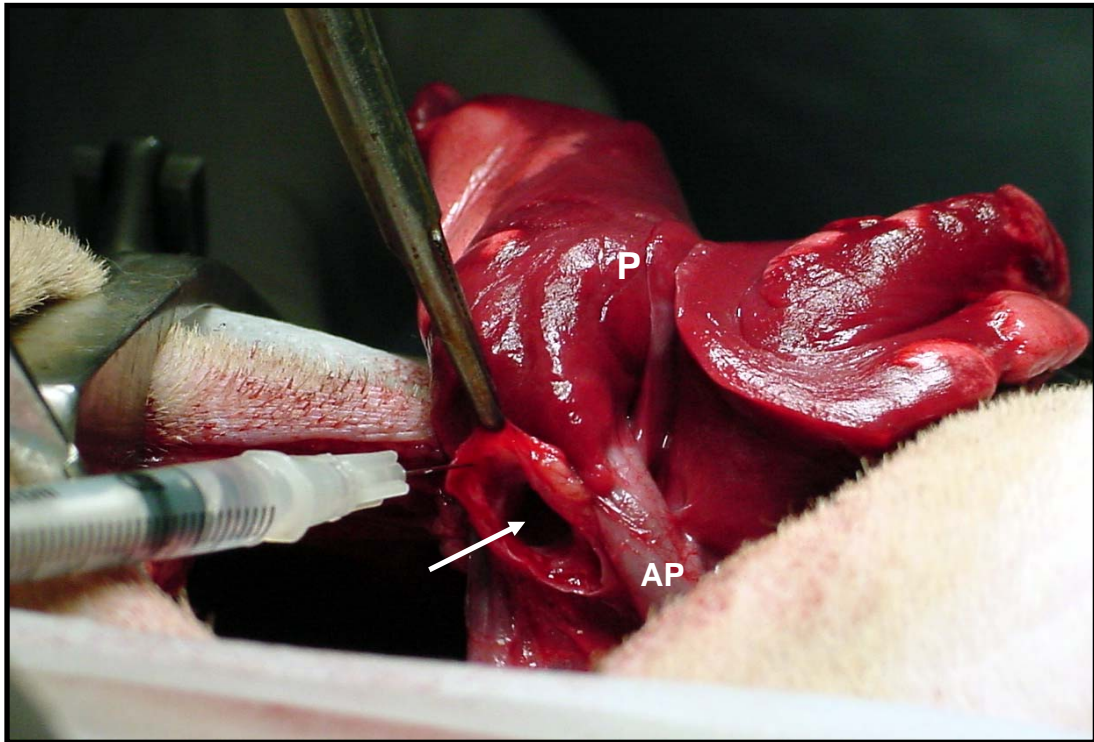


Fig. 2. Terapia gênica do brônquio isquêmico. Aplicação da solução com VEGFph 165 nu, na submucosa da parede brônquica posterior, com uma seringa de 1 mL e agulha 27 G. Artéria pulmonar (AP), pulmão (P). Seta branca indica a luz brônquica.

### 5.3. Transferência do *phVEGF 165 nu*

O clone de cDNA do VEGF 165 humano com 930 pb, isolado de bibliotecas de cDNA a partir de células leucêmicas HL60, foi inserido no plasmídio pUC118 (Genentech, San Francisco, CA, USA) de expressão eucariótica com 4143 pb, o qual incluía também as seqüências de poliadenilação do SV40 e do gene da  $\beta$ -lactamase, que conferiu resistência à ampicilina para as células transfectadas. Neste construto (*phVEGF 165*), o promotor do citomegalovírus humano (736 pb) exerceu o controle sobre a expressão do cDNA do VEGF 165.

O plasmídio *phVEGF 165 nu* foi amplificado através da transformação de bactérias DH5 $\alpha$ <sup>®</sup> termossensíveis (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme o protocolo do fabricante (fig. 3). A seguir, o plasmídio era extraído com o Qiagen Plasmid Midi Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Valencia, CA, USA) (fig. 4), armazenando-o a -20° C.

Logo após a broncotomia, na submucosa da parede posterior do coto brônquico distal, foi aplicado, lentamente, e através de uma seringa de 1 mL (Becton, Dickinson e Co. Franklin Lakes, NJ, USA) com uma agulha 27 G, 50  $\mu$ g de *phVEGF 165 nu*, na temperatura ambiente, diluído em 200 $\mu$ L de solução fisiológica a 0,9 % (fig. 2). No grupo controle, apenas 200  $\mu$ L de solução fisiológica 0,9 % foi injetada.

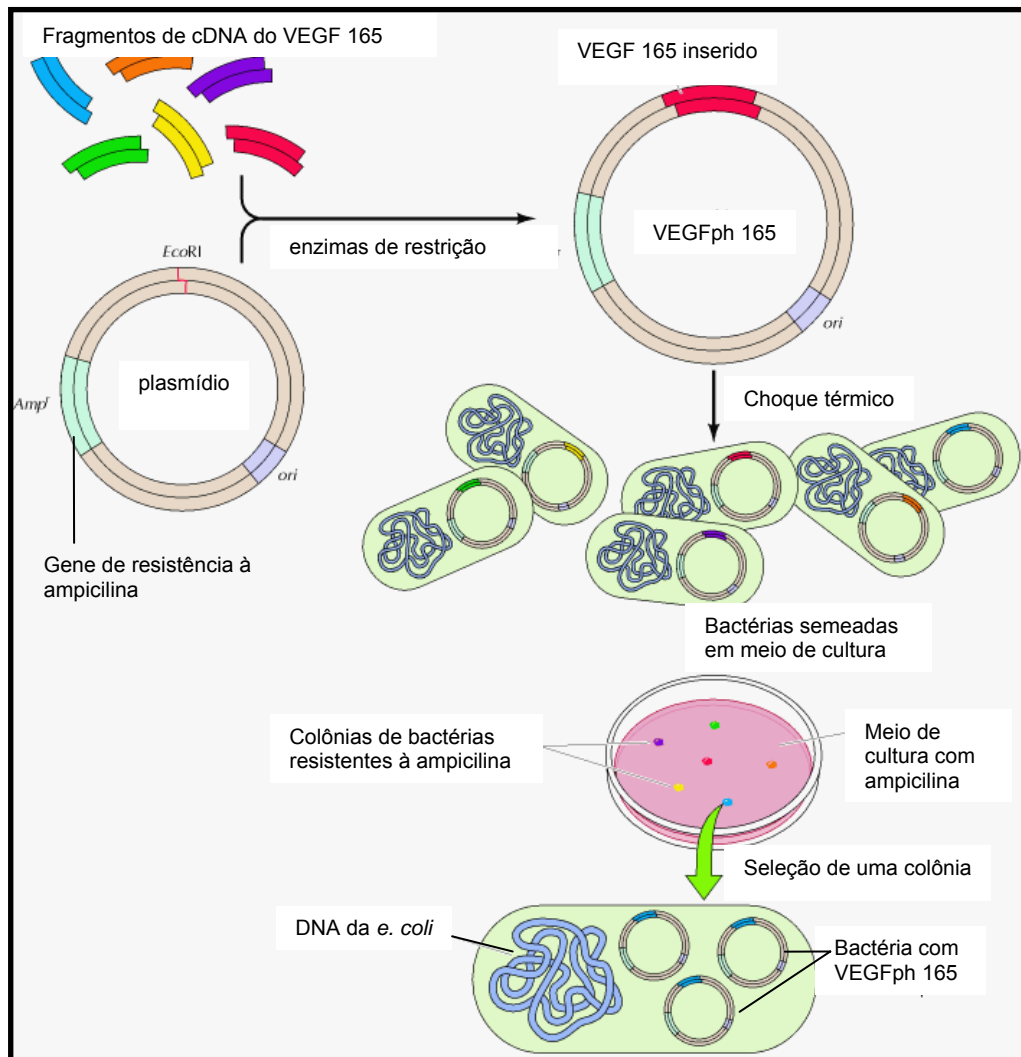


Fig. 3. Inserção do DNAc do VEGF 165 no plasmídeo e transformação bacteriana. Através de enzimas de restrição, insere-se o DNAc no plasmídeo. Após um choque térmico, bactérias *escherichia coli* DH5 $\alpha$ <sup>®</sup> termossensíveis recebem o plasmídeo phVEGF 165. Essas bactérias são inoculadas na placa de Petri com meio de cultura (ágar e ampicilina) para seleção e clonagem somente daquelas que possuem o plasmídeo. Figura modificada do livro “Na Bancada”, de Kathy Barker (ed. Artmed).



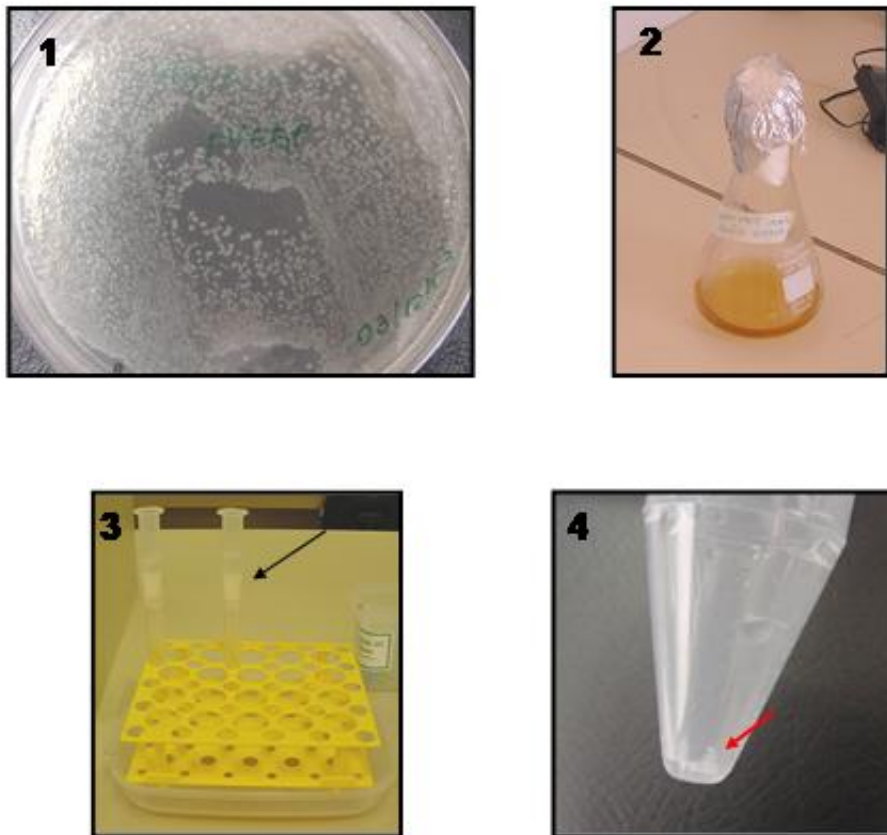


Fig. 4. Extração do plasmídio phVEGF 165. Foto 1: placa de Petri com meio de cultura seletivo (ágar com ampicilina) demonstrando várias colônias de bactérias DH5 $\alpha$ <sup>®</sup> contendo o plasmídio phVEGF 165. Foto 2: caldo de cultura LB (Luria Bertani) inoculado com amostra de uma única colônia da placa de Petri. Foto 3: extração do phVEGF 165 do caldo de cultura através de colunas de sílica (seta) (Qiagen Plasmid Midi Kit<sup>®</sup>). Foto 4: *pellet* (seta) do plasmídio purificado.

#### *5.4. Injeção do corante microvascular*

Para o estudo microvascular e identificação da revascularização sistêmica, no brônquio isquêmico, empregou-se látex 50 % (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e corante verde PVA para látex (Suviniil<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil).

Nos cães designados para o estudo microvascular, o látex era injetado na aorta torácica de acordo com a seguinte técnica: 1) anticoagulação com heparina sódica IV (300U/Kg) e eutanásia; 2) dissecação e clampeamentos do arco aórtico, logo abaixo da artéria subclávia, e da aorta torácica no nível do 6º espaço intercostal; 3) ligadura dos ramos intercostais esquerdos dorsais provenientes do segmento torácico descendente da aorta; 4) clampeamento da veia pulmonar direita; 5) punção da aorta torácica acima do clampe inferior com cateter intravenoso 14 G (Jelco<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) (fig.5); 6) injeção intra-aórtica de solução fisiológica 0,9% 250 mL a 37 °C; 7) infusão intra-aórtica de látex 30 mL com a pressão de 150 mmHg controlada por um manômetro aneróide.

A partir da injeção deste corante microvascular, foi considerado como indicador de revascularização sistêmica a identificação, sob microscopia óptica, de vasos submucosos do brônquio isquêmico com a luz preenchida pelo látex.

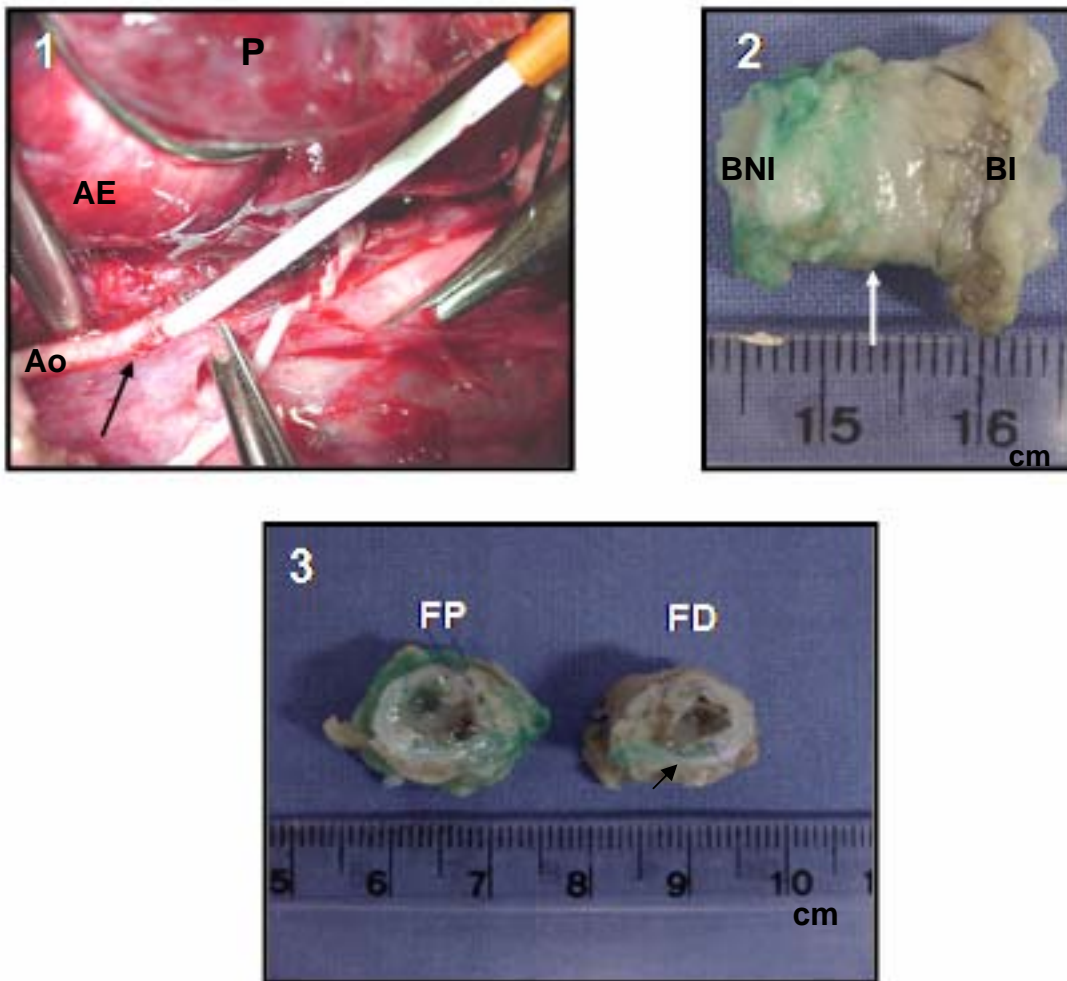


Fig. 5. Fotos do momento da punção da aorta e do brônquio esquerdo do cão 14 (VEGF) após injeção do corante microvascular. Foto 1: seta aponta local de punção da aorta torácica com cateter 14 G; pinças hemostáticas na emergência das artérias intercostais. Foto 2: segmento do brônquio esquerdo, incluindo a região da anastomose (seta). Adventícia do segmento não isquêmico com coloração verde do látex. Foto 3: corte transversal na anastomose; látex visível na face proximal não isquêmica; na face distal isquêmica, látex presente na submucosa no local de transfecção gênica (setas). Aorta (Ao); átrio esquerdo (AE); brônquio não isquêmico (BNI); brônquio isquêmico (BI); face proximal (FP); face distal (FD); pulmão (P).

### 5.5. Amostra do brônquio isquêmico

Nos 10 cães designados para o estudo de expressão gênica, foi coletada uma amostra (3 mg a 25 mg) da espessura total da parede posterior do brônquio isquêmico, na margem anastomótica transfectada com phVEGF 165 nu ou que recebeu solução fisiológica 0,9 %. Essas amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (-196 °C) e, a seguir, armazenadas a -70 °C para a posterior extração do RNA total e RT-PCR (*reverse transcription - polymerase chain reaction*).

### 5.6. Histologia

Nos demais cães operados, o brônquio principal esquerdo foi coletado após a injeção do látex e armazenado na formalina 10%. Posteriormente, cada um desses brônquios era dividido, na região da anastomose, em segmentos isquêmico e não isquêmico. Adicionalmente, realizavam-se dois cortes transversais (espessura de 2 mm) no segmento isquêmico do brônquio para inclusão na parafina: 1) 3 mm distal da anastomose (fragmento denominado de brônquio isquêmico proximal), e 2) 6 mm distal da anastomose (fragmento denominado de brônquio isquêmico distal) (fig. 6). O segmento brônquico não isquêmico também foi seccionado a 3 mm da anastomose para inclusão na parafina.

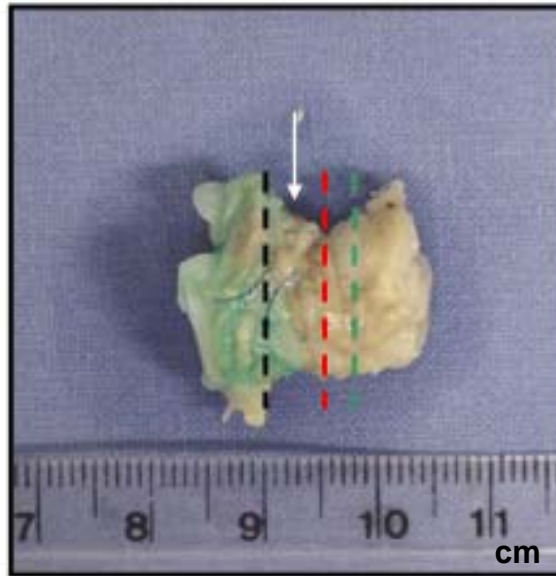


Fig. 6. Foto do segmento de brônquio principal do cão 14 (VEGF) na região da anastomose. As linhas pontilhadas indicam os locais dos cortes transversais que originaram os seguintes fragmentos brônquicos: 1) brônquio não isquêmico (linha preta), 2) brônquio isquêmico proximal (linha vermelha), e 3) brônquio isquêmico distal (linha verde). Nota-se a diferença de cor definida pela maior presença do látex verde na face externa do brônquio não isquêmico. Seta branca sinaliza a região da anastomose.

Nos fragmentos brônquicos já inclusos na parafina, realizavam-se cortes histológicos com espessura de 5 µm. A seguir, receberam a coloração pelo método de hematoxilina-eosina para a análise histológica e estudo microvascular, ou foram submetidos ao protocolo de imunistoquímica com anticorpo anti-VEGF.

No estudo microvascular do brônquio isquêmico proximal e distal, um único observador cego para o grupo experimental empregou o microscópio óptico Olympus® BX 41 (Olympus, Tokyo, Japan) com as objetivas de 4 X, 10 X, 20X, 40 X e 100X, acoplado numa máquina fotográfica PM-20 (Olympus). Foram utilizados campos de grande aumento (400X) que cobriram toda a circunferência da submucosa brônquica para identificar a presença de revascularização sistêmica (vasos com látex na submucosa) e calcular o número total dos vasos submucosos preenchidos com látex.

Também pesquisaram-se alterações patológicas sugestivas de isquemia da via aérea (necrose de coagulação, edema e descamação do epitélio respiratório). Para melhor definir os vasos preenchidos pelo látex e as alterações epiteliais, foram realizadas medidas morfométricas do diâmetro dos capilares e da espessura do epitélio respiratório através do programa SigmaScan Demo Image Analysis 5.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

### *5.7. Expressão protéica do VEGF*

Realizou-se a imunistoquímica para avaliar a expressão da proteína VEGF, no fragmento de brônquio isquêmico proximal, e identificar a célula que foi efetivamente transfectada.

O tecido incluso no bloco de parafina foi seccionado, na espessura de 5 µm, e submetido à desparafinização. Logo a seguir, cada amostra pré-tratada com tampão citrato 10 mM (pH 7,0) foi aquecida num forno de microondas Panasonic®,

modelo NN-S62BH (Panasonic, Manaus, AM, Brasil), ajustado na potência 9, durante 20 min, para recuperação antigênica. Após enxágüe com PBS, era realizado o bloqueio da peroxidase endógena, incubando a amostra no peróxido de hidrogênio 5% por 20 min. O bloqueio de reações inespecíficas se processou através da incubação do fragmento no leite em pó desnatado 5 % em PBS por 30 min. Cada amostra era incubada, a seguir, com anticorpo primário policlonal IgG de coelho anti-VEGF humano 1:400 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), durante 1 h, na temperatura ambiente. Depois, incubaram-se as amostras, seqüencialmente, com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (20 min), streptavidina peroxidase (20 min) e solução cromógeno-substrato DAB (Dako, Glostrup, Dinamarca) (20 min), sempre enxaguando com PBS no final de cada incubação. Finalmente, realizou-se a contra-coloração com hematoxilina através de uma rápida imersão do fragmento histológico.

Verificou-se, pela microscopia óptica com ampliação de 400X, a presença e a distribuição da impregnação granular marrom-clara, que indicava a expressão do VEGF no fragmento brônquico (VEGF+). A observação somente de tecido azulado (contra-coloração) significou ausência de expressão protéica (VEGF-). Também foi descrita a estrutura celular em que predominou a expressão protéica.

As fotomicrografias digitalizadas de quatro campos de grande aumento (400X), aleatoriamente escolhidos, do epitélio respiratório VEGF+, foram modificadas para uma escala com 256 níveis de intensidade de cinza a fim de quantificar a expressão protéica do VEGF, através de densitometria óptica, empregando o programa UVIDocMw<sup>®</sup> *digital imaging system* versão 10.01 (Uvtec, Cambridge, Inglaterra). Os resultados do grupo experimental foram descritos pela média, em unidades densitométricas (UD), calculada a partir das quatro medições de cada animal.

### 5.8. Expressão Gênica do VEGF

A transferência do plasmídeo ao tecido-alvo e a expressão do cDNA do VEGF 165 foram confirmadas mediante a realização do RT-PCR. Para isso, extraiu-se o RNA total da amostra de brônquio isquêmico, previamente armazenada a -70 °C, através do RNeasy Mini Kit® (Qiagen) conforme as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria e armazenado a -70 °C até a realização do RT-PCR.

Através do RT-PCR, amplificaram-se o cDNA (primeira fita) correspondente ao RNAm do VEGF 165 humano e ao RNAm de um gene constitucional canino, o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) que, além de ser uma amostra da homeostasia celular do cão, funcionou como controle interno. Para isso, utilizaram-se os seguintes primers (Invitrogen) desenhados pelos pesquisadores: VEGF 165 *sense* (5' TTC-ATG-GAT-GTC-TAT-CAG-CG 3') e VEGF 165 *antisense* (5'GCT-CAT-CTC-TCC-TAT-GTG-CT 3'); GAPDH *sense* (5' GCC-AAC-ATC-AAA-TGG-GGT-GA 3') e GAPDH *antisense* (5' CAT-ATT-TGG-CAG-CTT-TCT-CC 3'). Os primers definiram segmentos de cDNA amplificados, com 234 pb, para o VEGF 165 e, 470 pb, para o GAPDH canino.

No tubo de amplificação, foi colocado o RNA total (50 ng a 250 ng) e acrescentaram-se os seguintes reagentes: 2X *Reaction Mix* (0,4 mM de cada dNTP e 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>) 12,5 µL (Invitrogen), 1 µL de cada primer (10 µM), *Superscrip<sup>tm</sup> II RT/Platinum® Taq Mix* 0,5 µL (Invitrogen) e água destilada para completar o volume final de 25 µL.

No termociclador, o tubo de reação foi, inicialmente, incubado a 50 °C 30 min para síntese da primeira fita de cDNA e, após, a 94°C 2 min para a pré-desnaturação. A amplificação do cDNA foi processada pela seqüência de 35 ciclos



de desnaturação a 94 °C 15 s, de anelamento a 55 °C 30 s, e de extensão a 72 °C 1 min.

Uma amostra de 12 µL de cada 25 µL do produto do RT-PCR foi analisada pela eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídio. A partir da aplicação de marcadores de peso molecular conhecidos, a banda eletroforética correspondente ao gene VEGF ou GAPDH foi identificada através do número de pares de base.

Imagens digitalizadas do gel de agarose, em que se realizou a eletroforese, foram modificadas para uma escala de 256 níveis de intensidade de cinza a fim de quantificar, com o programa UVIDocMw<sup>®</sup> *digital imaging system* 10.01, a densitometria óptica das bandas eletroforéticas do VEGF e do GAPDH. Calculou-se a razão densitométrica do VEGF/GAPDH, em cada cão, descrevendo o resultado em unidade densitométrica relativa (UR).

### 5.9. Estatística

Utilizou-se o teste *t* de *student* não pareado com contribuição das variâncias para comparar a média das expressões gênica e protéica entre os grupos experimentais. Também foi analisada a relação entre o número total de vasos submucosos preenchidos com látex, no brônquio isquêmico distal, e a intensidade da expressão protéica do VEGF (UD) através do cálculo do coeficiente de correlação linear de Spearman ( $r_s$ ). Considerou-se uma diferença estatisticamente significativa quando o  $p < 0,05$ . Para isso, utilizamos o programa PEPI 3.0 (J.H. Abramson & Paul M. Gahlinger, SaltLake City, UT, USA).

## 6. RESULTADOS

O procedimento experimental foi realizado em 18 cães, com tempo médio de cirurgia de  $67,6 \pm 8,14$  min para o grupo VEGF e de  $68,25 \pm 12,99$  min para o grupo controle. Houve dois óbitos: o cão número 10 do grupo VEGF apresentou uma parada cardiorrespiratória durante a indução anestésica, e o cão número 8 do grupo controle desenvolveu hemorragia intestinal no 2° pós-operatório.

Desta forma, analisaram-se os resultados de 17 cães sobreviventes até o 3° pós-operatório: em 10 segmentos de brônquio isquêmico (cinco do grupo VEGF e cinco do grupo controle) foi estudado a expressão gênica, enquanto que, nos outros sete segmentos brônquicos (quatro do grupo VEGF e três controles), realizaram-se as análises histológica, microvascular e imunoistoquímica.

Os principais resultados foram descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Presença de revascularização sistêmica, número de vasos com látex e expressões gênica e protéica dos 17 segmentos de brônquio isquêmico analisados após três dias da transfecção com phVEGF 165 nu.

Brônquio isquêmico/grupo experimental	VEGF (n)	Controle (n)
Revascularização sistêmica	100 % (4)	0 (3)
Número de vasos com látex na submucosa*:		
proximal <sup>‡</sup>	12,25±15,81 (4)	0 (3)
distal <sup>§</sup>	56,25±83,07 (4)	0 (3)
Densitometria Óptica:		
Expressão Gênica* <sup>  </sup>	0,86±0,15 UR (4) <sup>¶</sup>	0,05 ± 0,10 UR (5)
Expressão Protéica <sup>†  </sup>	337160,25±21221,88UD(4)	189404,66±37861,04UD (3)

\* Resultados descritos em média e desvio padrão

† Resultados descritos em média e erro padrão

‡ 3 mm distal da anastomose

§ 6 mm distal da anastomose

|| Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos

¶ Cão 19 foi excluído da análise por não apresentar bandas eletroforéticas

n = número de animais analisados

UD = unidade densitométrica

UR = unidade densitométrica relativa

### 6.1. *Macroscopia*

Em todos animais, a anastomose brônquica estava recoberta com tecido conjuntivo mediastinal e mostrava-se preservada, sem fístulas ou deiscências (fig. 5).

### 6.2. *Histologia*

Nos segmentos de brônquio isquêmico do grupo VEGF, houve 100% de revascularização sistêmica a partir da observação de vasos da submucosa preenchidos com o látex (Tabela 1 e fig. 7). Esses microvasos apresentavam diâmetros entre 10  $\mu\text{m}$  e 50  $\mu\text{m}$  e foram, na média, quatro vezes mais numerosos no segmento a 6 mm distal da anastomose (fragmento de brônquio isquêmico distal) e na parede posterior do brônquio (tabela 1). Apenas um cão do grupo VEGF apresentou vasos com látex por toda a circunferência da luz brônquica. Entretanto, não ocorreu revascularização sistêmica nos três brônquios isquêmicos analisados do grupo controle, ou seja, o látex não atingiu nenhum vaso submucoso.

Todos os segmentos de brônquio não isquêmico dos dois grupos apresentaram múltiplos vasos com o corante microvascular (fig. 8), confirmando o percurso transanastomótico da revascularização.

Observou-se, nos fragmentos de brônquio isquêmico distal, uma melhor preservação da estrutura da parede brônquica, a partir da identificação de glândulas da submucosa viáveis, ausência de fibrose ou hemorragia, mínima infiltração de células inflamatórias, pouco ou nenhum edema e um epitélio respiratório com estrutura típica (cílios, células caliciformes e do tipo pseudoestratificado) e espessura de 140  $\mu\text{m}$  a 200 $\mu\text{m}$  (fig. 8).

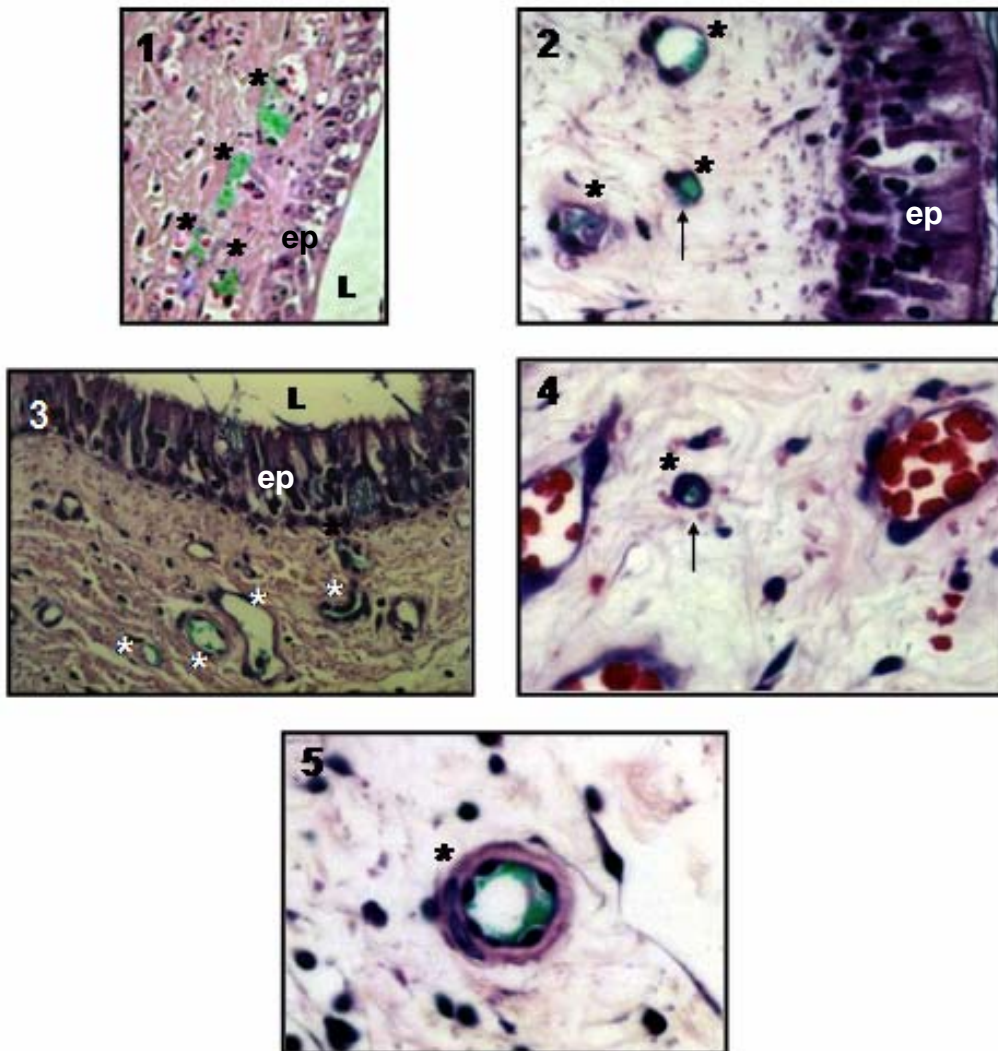


Fig. 7. Fotomicrografias mostrando a presença do corante na submucosa do brônquio isquêmico. Foto 1: brônquio isquêmico proximal (cão 14, VEGF). Note-se o epitélio respiratório sem cílios. Foto 2: brônquio isquêmico distal (cão 16, VEGF). Capilar de 15  $\mu\text{m}$  (seta preta). Epitélio respiratório pseudoestratificado com cílios. Foto 3. brônquio isquêmico distal (cão 16) com epitélio respiratório íntegro. Foto 4: brônquio isquêmico distal com capilar de 10  $\mu\text{m}$  (seta preta). Foto 5: brônquio isquêmico distal (cão 16). Arteríola de 74  $\mu\text{m}$ . Vaso preenchido com látex (\*); epitélio (ep), luz brônquica (L) . (hematoxilina-eosina; ampliação original: foto 1 = 200X, foto 2,3, 4 e 5= 400X).

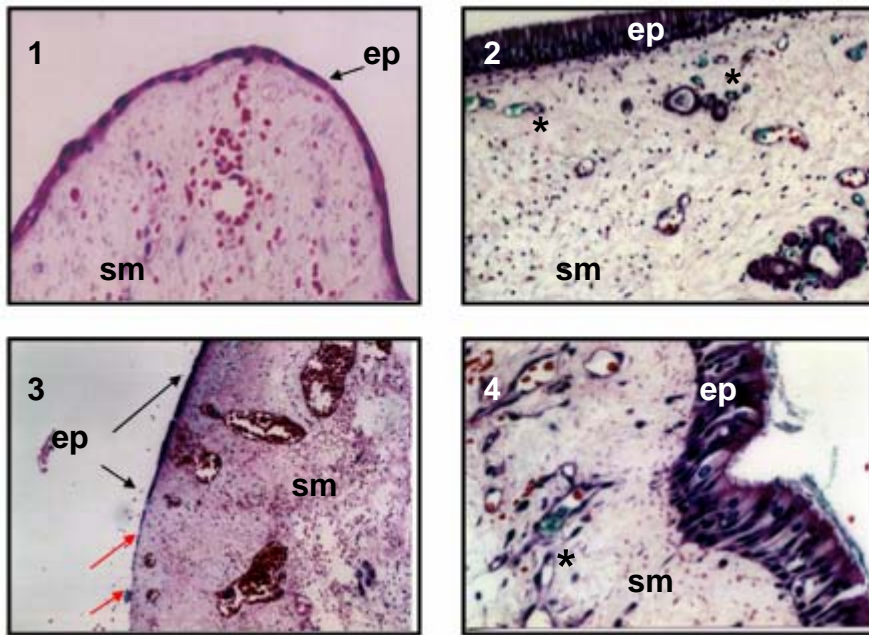


Fig. 8. Fotomicrografias do brônquio principal após três dias da broncotomia. Foto 1: Epitélio (ep) simples e necrose de coagulação na submucosa (sm) do brônquio isquêmico proximal (cão 13, controle). Foto 2: epitélio pseudoestratificado e vários capilares com látex (\*) no brônquio não isquêmico (cão 16, VEGF). Foto 3: brônquio isquêmico proximal com áreas de epitélio descamado (setas vermelhas) ou simples (ep) com 56  $\mu\text{m}$  de espessura. Vasos com trombos na submucosa (cão 17, VEGF). Foto 4: epitélio pseudoestratificado com espessura de 146  $\mu\text{m}$  e vaso (\*) preenchido com látex na submucosa do brônquio isquêmico distal (cão 17, VEGF) (hematoxilina-eosina; ampliação original: foto 1 e 4 = 400X; foto 2 e 3= 100X).

Em todos os fragmentos de brônquio isquêmico proximal dos dois grupos experimentais, houve evidências de isquemia focal como descamação da mucosa, infiltração intensa de células inflamatórias (polimorfonucleares), edema, fibrose, hemorragia e necrose de coagulação da submucosa, associadas a áreas com alguma desorganização estrutural da parede brônquica. Não ocorreram sinais de necrose da cartilagem brônquica ou formação de hemangiomas. O epitélio respiratório tinha uma espessura menor (56  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ ) e apresentava-se, predominantemente, como epitélio simples ou com metaplasia reacional, sem cílios e raras células caliciformes (fig. 8).

### *6.3. Expressão Protéica do VEGF*

Todos os fragmentos de brônquio isquêmico proximal, em ambos os grupos experimentais, submetidos à análise imunoistoquímica, foram considerados VEGF+. Somente o epitélio respiratório apresentou expressão do VEGF, por quase toda circunferência brônquica (fig. 9). Nos dois grupos, algumas regiões foram VEGF-, mas nunca incluíram a parede posterior do brônquio e não se estenderam por mais de 30 % do epitélio respiratório.

Apesar de todos os animais apresentarem brônquio isquêmico VEGF+, a intensidade da expressão protéica, medida em UD, foi 89 % maior, no grupo VEGF, conferindo uma diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,015$ ) entre os dois grupos experimentais (fig. 10).

Também houve uma correlação positiva ( $r_s = 0,927$ ), estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ), entre o número de vasos preenchidos com látex no fragmento de brônquio isquêmico distal e a intensidade da expressão protéica do VEGF (fig. 11).

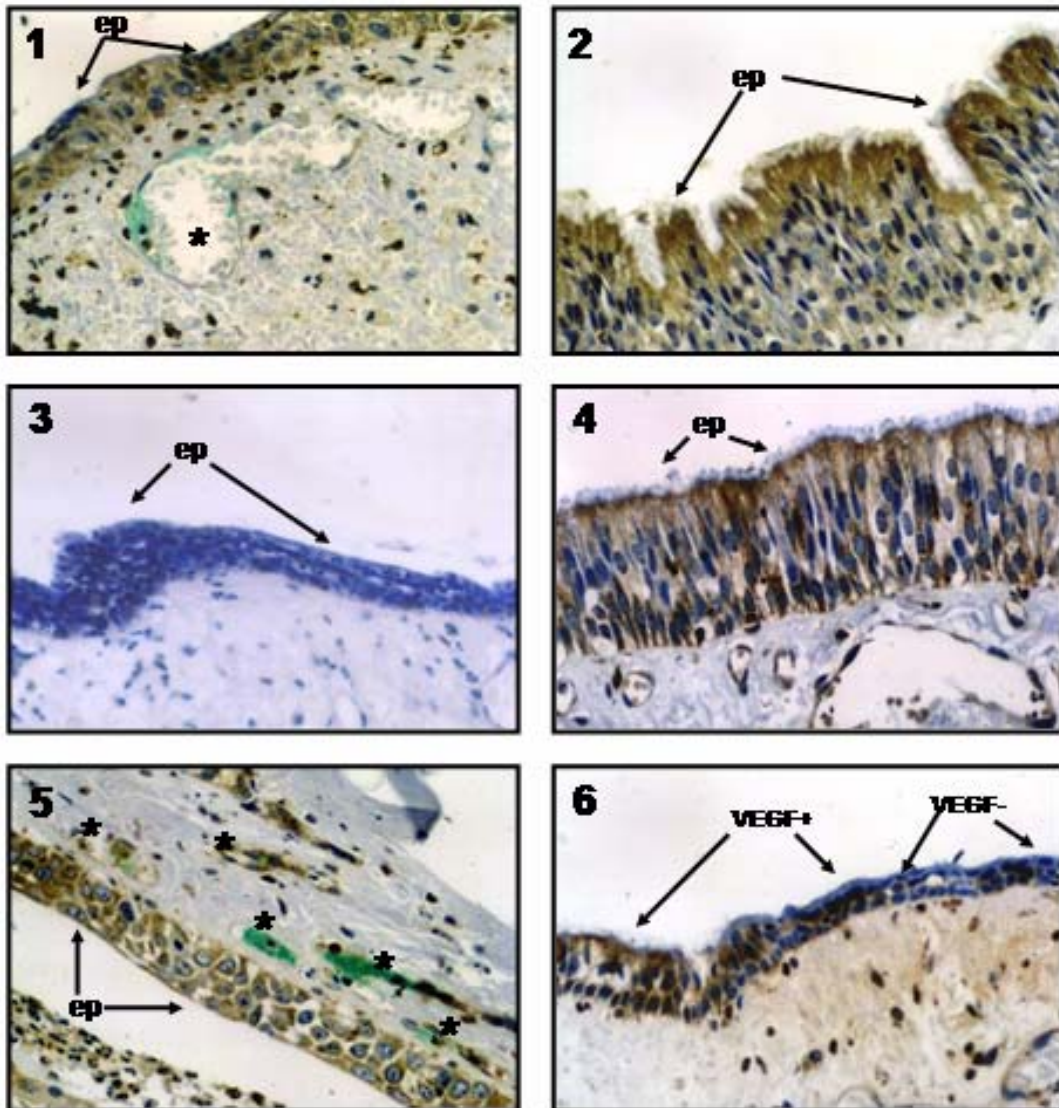


Fig. 9. Imunoistoquímica anti-VEGF. Fotomicrografias da submucosa e do epitélio respiratório no brônquio isquêmico. Foto 1: epitélio respiratório (ep) VEGF+ (cão 17, VEGF). Vaso (\*) na submucosa preenchido com látex. Foto 2: epitélio respiratório VEGF+ (cão 7, controle). Foto 3: epitélio respiratório VEGF- (cão 13, controle). Foto 4: epitélio respiratório VEGF+ (cão 14, VEGF). Foto 5: epitélio respiratório VEGF+, contrastando com os vários vasos preenchidos com látex (cão 14, VEGF). Foto 6: transição entre epitélio respiratório VEGF+ e VEGF- (cão 16, VEGF) (ampliação original das fotos = 400X).



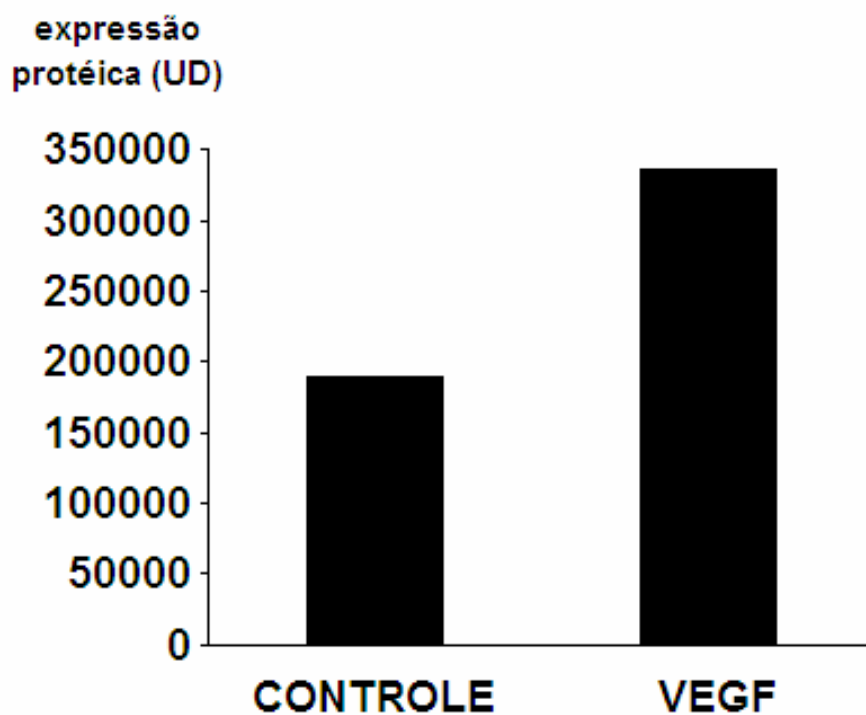


Fig. 10. Médias em UD da expressão protéica do VEGF na submucosa do brônquio isquêmico nos grupos controle e VEGF após três dias da broncotomia. A média em UD do grupo VEGF foi estatisticamente superior ao do grupo controle ( $p = 0,015$ ). Unidade densitométrica (UD).

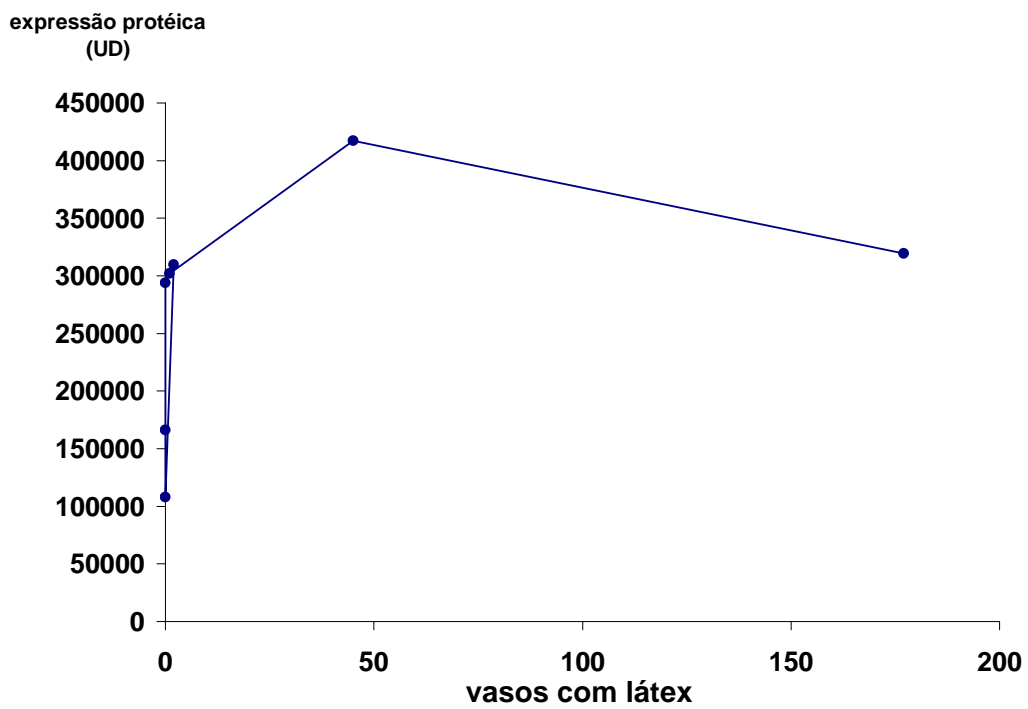


Fig. 11. Correlação linear entre a intensidade da expressão protéica do VEGF (UD) e o número de vasos preenchidos com látex. ( $r_s=0,927$ ;  $p < 0,01$ ).

#### 6.4. Expressão gênica do VEGF

No grupo VEGF, a expressão gênica média do VEGF atingiu 86% do GAPDH. Enquanto que, no grupo controle, essa expressão ficou em apenas 5 % do GAPDH. Desta maneira, a expressão gênica de VEGF, no grupo que recebeu terapia gênica, foi estatisticamente maior ( $p= 0,000$ ) (fig. 12 e 13).

Excluiu-se o cão 19 (grupo VEGF) da análise de expressão gênica, pois este não apresentou produtos do RT-PCR, devido à falha na extração do RNA total.

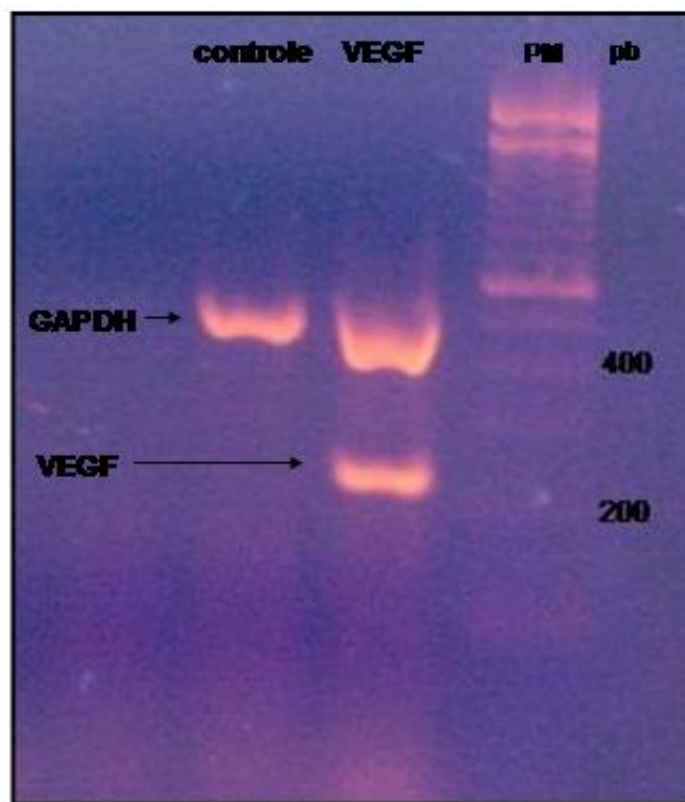


Fig. 12. Foto do gel de agarose após a eletroforese do produto do RT-PCR. Cães 4 (grupo controle) e 1 (grupo VEGF) . O cão 1 apresentou banda eletroforética do VEGF, enquanto o cão 4 mostrou somente banda do GAPDH. Peso molecular padronizado (PM); pares de bases nitrogenadas (pb).

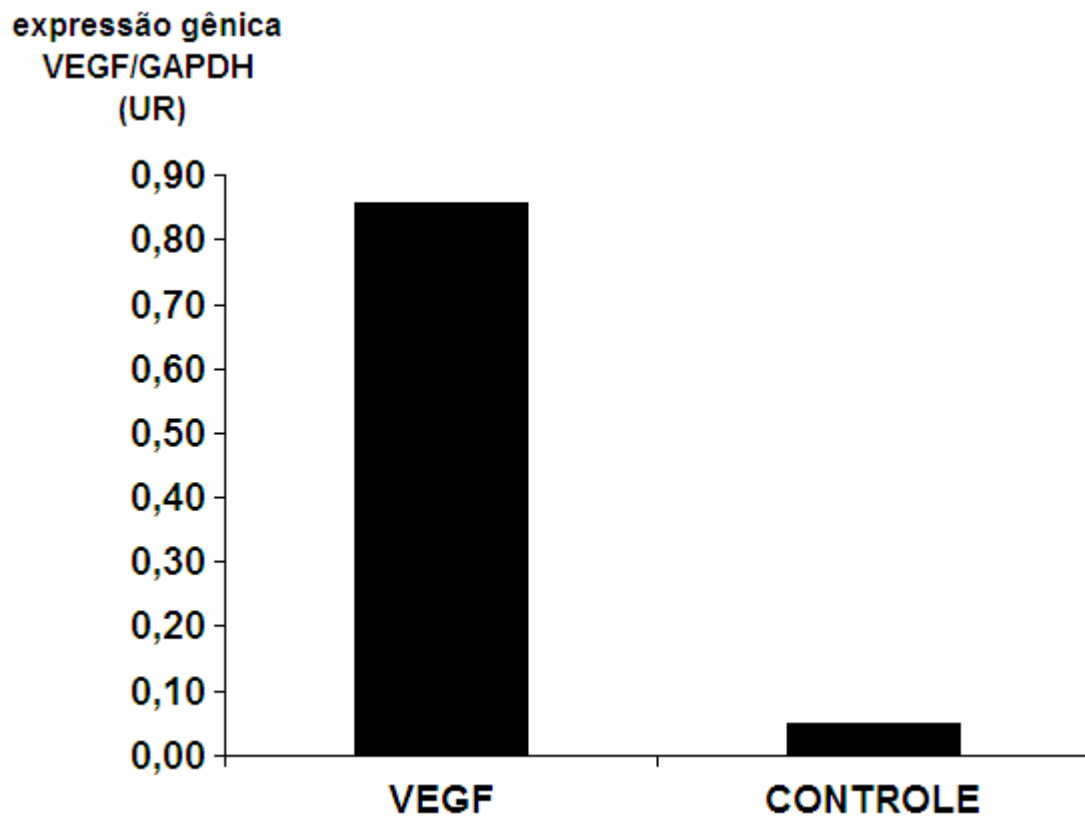


Fig. 13. Expressão gênica. Médias em UR da razão densitométrica do VEGF/GAPDH nos grupos VEGF e controle. A média das UR do grupo VEGF foi estatisticamente superior ao do grupo controle ( $p = 0,000$ ). Unidade densitométrica relativa (UR).

## 7. DISCUSSÃO

A relevância da circulação sistêmica brônquica para a homeostasia alveolar vem recebendo destaque<sup>(10, 30-31)</sup>, uma vez que a presença desta circulação exerceria papel crucial na recuperação dos pacientes com transplante pulmonar.

Como o pulmão é o único órgão sólido transplantado sem o restabelecimento imediato da circulação arterial sistêmica, passaria por um período isquêmico de 15 dias, até a recanalização espontânea das artérias brônquicas<sup>(32-33)</sup>. Por conseguinte, esta condição hipoxêmica participaria dos mecanismos desencadeantes das complicações pós-transplante<sup>(9, 11, 34-36)</sup>.

A necessidade de abreviar o tempo de isquemia do enxerto pulmonar, através do retorno precoce da circulação sistêmica, aliado aos bons resultados da terapia gênica com VEGF 165, na revascularização de tecidos isquêmicos<sup>(27-28)</sup>, levou-nos a investigar esse método de angiogênese terapêutica molecular para promover o surgimento de pontes microvasculares do brônquio isquêmico em direção à via aérea proximal não isquêmica. Neste intuito, o presente estudo tornou-se pioneiro na revascularização brônquica com phVEGF 165 em três dias.

A conjugação das qualidades exclusivas do VEGF 165<sup>(20-24, 37, 38)</sup> com a amplificação do seu efeito angiogênico pelo próprio ambiente isquêmico<sup>(22, 25-27, 39)</sup> justificam o sucesso do nosso protocolo de angiogênese terapêutica. O estímulo resultante para proliferação capilar proporcionou a reconecção da circulação sistêmica brônquica, em 72 horas, permitindo o preenchimento de capilares submucosos com corante microvascular desde a região próxima à broncotomia até, pelo menos, 6 mm distal, no brônquio isquêmico.

Já que estudos com a revascularização indireta da via aérea isquêmica, mediante omentopexia, necessitaram ao redor de uma semana para promover o surgimento de circulação sistêmica no brônquio doador, o que contribuiu para a

manutenção das complicações isquêmicas<sup>(17, 40-41)</sup>, aparece o phVEGF 165 como uma alternativa viável de promover uma angiogênese terapêutica mais precoce.

Na atual pesquisa, a proliferação capilar na anastomose que proporcionou o aparecimento de capilares com látex no brônquio isquêmico seria também suficiente para garantir fluxo sistêmico arterial até a pleura visceral conforme os estudos arteriográficos de Lima et al.<sup>(42)</sup>, reduzindo, desta maneira, o período isquêmico do enxerto pulmonar para três dias no máximo.

A provável reperusão sistêmica da totalidade da via aérea doadora, incluindo todo pulmão, com a reconecção precoce da circulação brônquica a partir da angiogênese na região da anastomose foi reforçada pela verificação, no brônquio mais distal, de um número de vasos preenchidos pelo látex quatro vezes maior, semelhante aos achados prévios de Mäkinen et al.<sup>(43)</sup> e Kondoh et al.<sup>(25)</sup>, que mostraram, de forma menos contundente, até 1,25 vezes mais vasos em regiões mais distais da transfecção gênica do músculo estriado com VEGF 165.

Também a melhor perfusão retrógrada da circulação pulmonar presente no segmento mais distal do brônquio principal resultaria na melhor preservação da estrutura brônquica do segmento mais distal<sup>(9, 44)</sup>, o que foi observado no presente estudo, e, conseqüentemente, da rede microvascular, justificaria, parcialmente, os sinais de revascularização sistêmica mais intensos com mais vasos preenchidos pelo látex.

Quando Leung et al.<sup>(37)</sup>, em 1989, desvendavam as ações do VEGF 165, demonstraram que o estímulo para proliferação capilar já estava presente, pelo menos, nas primeiras 48 h após a transfecção gênica com VEGF 165 humano, *in vitro*. Entretanto, os trabalhos subseqüentes, *in vivo*, de Takeshita et al.<sup>(45)</sup>, Galeano et al.<sup>(46)</sup>, Rissanen et al.<sup>(47)</sup> e Banai et al.<sup>(48)</sup> descrevem um aumento da proliferação capilar pelo estímulo do rhVEGF 165 apenas a partir do 5º dia.

Desta forma, o nosso trabalho confirmou, *in vivo*, os achados de Leung et al.<sup>(37)</sup> com relação ao poder do VEGF 165 em estimular a angiogênese em poucos

dias. A ausência das dificuldades descritas por outros laboratórios<sup>(42, 48-51)</sup> na identificação histológica de sinais de revascularização, logo após a transfecção gênica, podem ter corroborado para os resultados coletados com a avaliação microvascular de apenas três dias.

Ainda, no estudo atual, o sucesso da transfecção e de expressão do phVEGF 165, conferidos pelo RT-PCR, permitiu o surgimento desta angiogênese precoce no brônquio isquêmico. Trabalhos de angiogênese terapêutica, em outros tecidos, como de Tsurumi et al.<sup>(22, 52)</sup> com músculo isquêmico, e de Takeshita et al.<sup>(38)</sup> com musculatura lisa vascular, já haviam comprovado o efeito da aplicação do phVEGF 165 sobre a melhora da perfusão tecidual, através do desenvolvimento de vasos colaterais e da rede capilar, a partir da proliferação endotelial e de células musculares lisas.

Portanto, o nosso trabalho foi o primeiro a demonstrar a factibilidade da transferência de um plasmídeo com o gene codificante do VEGF 165 na via aérea isquêmica. Além disso, a expressão gênica controlada pelo plasmídeo pUC118 foi suficiente para iniciar a reconecção da circulação brônquica, em três dias, a partir do acréscimo significativo e suprafisiológico de VEGF, na via aérea isquêmica, detectado ao nível protéico pela imunistoquímica. Este resultado confirma a robusta capacidade de transcrição e síntese protéica demonstrada pelo brônquio transfectado sob isquemia.

Aliás, os brônquios isquêmicos dos nossos animais controles de nosso estudo, submetidos ao estudo imunistoquímico, também mostraram a presença da expressão protéica de VEGF. Esse resultado foi reflexo, provavelmente, da isquemia tecidual, instalada logo após a broncotomia. O estímulo isquêmico, já nas primeiras 2h, eleva a transcrição do RNAm do VEGF, em sete a oito vezes, e, ao mesmo tempo, promove uma maior estabilidade deste transcrito, de acordo com os estudos de Ladoux et al.<sup>(53)</sup> e Iizuka et al.<sup>(54)</sup> em tecidos submetidos à isquemia.



Adicionalmente, a presença deste VEGF pode ter se originado da liberação de estoques intra e extracelular, associada ao trauma cirúrgico<sup>(28, 55)</sup>.

Embora os trabalhos prévios demonstrassem uma dissociação entre a intensidade da expressão protéica e o efeito biológico<sup>(56-57)</sup> de uma proteína secretada para o extracelular (como o VEGF), o nosso estudo comprovou que a intensidade da angiogênese, no brônquio isquêmico, esteve relacionada à maior expressão de VEGF: quantidades desta proteína (presumidas pela imunistoquímica) que se encontravam logo acima do limite superior fisiológico já foram suficientes para induzir uma proliferação capilar capaz de iniciar a reperfusão sistêmica brônquica, com incrementos à medida que a síntese de VEGF se elevou. Isto comprova a dependência da revascularização precoce com os níveis protéicos suprafisiológicos do VEGF.

Na análise imunistoquímica, identificamos como sendo o epitélio respiratório a estrutura celular principal em que se sucedeu a transfecção gênica e a expressão protéica do VEGF. Ao mesmo tempo, verificamos, através do estudo histológico, uma melhor preservação deste epitélio, no brônquio isquêmico distal, coincidindo com o segmento de via aérea com mais vasos com látex. Krebs et al.<sup>(58)</sup>, Fehrenbach et al.<sup>(59)</sup> e Brown et al.<sup>(60)</sup>, além de descrever os efeitos proliferativo e inibidor da apoptose epitelial, associados ao VEGF, igualmente ressaltaram que o próprio epitélio respiratório seria a principal origem pulmonar deste fator angiogênico, achado confirmado em nosso estudo. Além disso, a preservação do epitélio, verificado no estudo atual, também poderia resultar numa amplificação do efeito angiogênico a partir da síntese do VEGF epitelial e explicar o aparecimento de diversos capilares com látex no brônquio isquêmico mais distal.

Várias foram as razões para o êxito do nosso plasmídeo. Primeiro, a intensa expressão gênica do VEGF 165 que permanece até 21 dias, demonstrada por Kondoh et al.<sup>(25)</sup>, Leung et al.<sup>(37)</sup> e Tsurumi et al.<sup>(22)</sup>, após a transfecção com o plasmídeo pUC118 de tecidos isquêmicos, diferentes do brônquio. Esta qualidade

pode ter compensado a baixa taxa de transfecção (0,5 % a 2,2 % das células-alvo) relatada na literatura<sup>(22, 38)</sup>.

Segundo, a diluição do phVEGF 165 em um volume grande de solução, em relação à área transfectada, garante uma distribuição mais uniforme e uma maior expressão gênica, conforme destacou Takeshita et al.<sup>(52)</sup> e Wolff et al.<sup>(61)</sup> em seus protocolos de terapia gênica.

Terceiro, há um aumento de cinco vezes, na eficiência da transferência gênica, para as células em proliferação, conforme o estudo de Takeshita et al.<sup>(62)</sup> com mioblastos. Situação semelhante possivelmente transcorreu, em nosso estudo, a partir da presença de estímulo proliferativo do próprio VEGF sobre o epitélio respiratório<sup>(60)</sup>.

Quarto, mesmo que a transfecção e a expressão gênicas ocorressem com sucesso em poucas células, o destacado efeito parácrino do VEGF<sup>(24)</sup>, como produto gênico secretado, já seria suficiente para iniciar a angiogênese.

E, finalmente, o quinto motivo estaria na administração tópica de um plasmídeo nu que certamente restringiu sua área de ação na região isquêmica brônquica com grande densidade de receptores VEGF<sup>(22, 25-27, 39)</sup>.

A escolha por um plasmídeo nu pareceu ser o mais adequado, uma vez que evita possíveis reações imunológicas associadas a vetores virais<sup>(63)</sup> e lipossômicos<sup>(64)</sup>, o que amplia a aplicação clínica deste protocolo de terapia gênica para pacientes em que a imunossupressão é intensa e mandatória, como nos transplantes. Ademais, em nosso experimento, não encontramos problemas relacionados com a transferência de cDNA do VEGF, outrora relatados na literatura<sup>(65)</sup>, como edema intenso, necrose no local da aplicação do plasmídeo e hipotensão.

## **8. Conclusões**

Com esses resultados, podemos concluir pela capacidade da transfecção do plasmídio nu phVEGF 165 no brônquio isquêmico, a partir do aumento da expressão gênica e protéica do VEGF. Esse estímulo angiogênico suprafisiológico garantiu o sucesso da revascularização da via aérea isquêmica em três dias, com a demonstração de sinais de perfusão sistêmica na submucosa brônquica pela presença do corante microvascular.

## **9. Perspectivas**

O êxito na transferência gênica e a presença de circulação brônquica na via aérea isquêmica podem representar o primeiro passo para o desenvolvimento de um método simples de revascularização precoce do brônquio doador em transplantes pulmonares. Pesquisas futuras deverão confirmar se os novos capilares desenvolvidos serão suficientes para erradicar as complicações isquêmicas ou, pelo menos, amenizar as agressões imunogênicas, inflamatórias e infecciosas do pulmão transplantado.

A adição de vetores de transferência, o aumento da dose de phVEGF 165 e a administração de terapia gênica, através da broncoscopia do paciente doador, podem ser explorados, objetivando uma expressão mais intensa e precoce do VEGF.

## **10. Bibliografia**

1. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Walker GR. Lung homotransplantations in man. JAMA 1963;186:1065-74.
2. Vigneswaran WT, Sakiyalak P, Bhorade S, Bakhos M. Airway complications after isolated lung transplantation. Transpl Rev 2002;16:87-94.

3. Singer LG, Weinacker AB, Theodore J. Long-term management and outcome of heart-lung and lung transplant recipients. In: Baumgartner WA, Reitz B, Kasper E, Theodore J. (Ed) Heart and Lung Transplantation. 2<sup>nd</sup> Edition, Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2002.
4. Wildevuur CRH, Benfield JR. A review of 23 human lung transplantations by 20 surgeons. *Ann Thorac Surg* 1970;9:489-515.
5. Patterson GA. Airway revascularization: is it necessary? *Ann Thorac Surg* 1993;56:807-8.
6. Miller JD, DeHoyos A. An evaluation of the role of omentopexy and of early perioperative corticosteroids administration in clinical lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:247-52.
7. Trulock EP. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:789-818.
8. Patterson GA, Todd TR, Cooper JD, Pearson FG, Winton TL, Maurer J. Airway complications after double lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;99:14-21.
9. Nørgaard MA, Olsen PS, Svendsen UG, Pettersson G. Revascularization of the bronchial arteries in lung transplantation: an overview. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1215-21.
10. Herold U, Jakob H, Kamler M, Thiele R, Tochtermann U, Weinmann J, et al. Interruption of bronchial circulation leads to a severe decrease in peribronchial oxygen tension in standard lung transplantation technique. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1998;13:176-83.
11. Bando K, Paradis IL, Similo S, Konishi I, Komatsu K, Zullo TG, et al. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. An analysis of risk factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:4-14.
12. Baudet EM, Dromer C, Dubrez J, Jougon JB, Roques X, Velly JF, et al. Intermediate-term results after en bloc double-lung transplantation with bronchial

revascularization. Bordeaux lung and Heart-Lung Transplant Group J Thorac Cardiovasc Surg 1996;112:1292-300.

13. Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, Boucek MM, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult lung and Heart-Lung transplant report – 2005. J Heart Lung Transplant 2005;24:956-67.

14. U.S. Department of Health and Human Services. 2005 Annual Report of the U.S. Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients: Transplant Data 1995-2004. Available at: <http://www.optn.org/AR2005>. Accessed June 14, 2006.

15. Couraud L, Baudet E, Martigne C, Roques X, Velly JF, Laborde N, et al. Bronchial revascularization in double-lung transplantation: series of 8 patients. Bordeaux Lung and Heart-Lung Transplantant Group. Ann Thorac Surg 1992;53:88-94.

16. Daly RC, McGregor CGA. Routine immediate direct bronchial artery revascularization for single-lung transplantation. Ann Thorac Surg 1994;57:446-52.

17. Date H, Trulock EP, Arcidi JM, Sundaresan S, Cooper JD, Patterson GA. Improved airway healing after lung transplantation. An analysis of 348 bronchial anastomoses. J Thorac Cardiovasc Surg 1995;110:1424-32.

18. Collinson DJ, Donnelly R. Therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease: can biotechnology produce an effective collateral circulation. Eur J Vasc Endovasc Surg 2004;28:9-23.

19. Simons M, Ware JA. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. Nature Reviews 2003;2:1-9.

20. Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, et al. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. J Clin Invest 2002;109:327-36.

21. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-8.
22. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeni J, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding VEGF augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996;94:3281-90.
23. Takeshita S, Isshiki T, Mori H, Tanaka E, Tanaka A, Umetani K, et al. Microangiographic assessment of collateral vessel formation following direct gene transfer of vascular endothelial growth factor in rats. *Cardiovasc Res* 1997;35:547-52.
24. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003;9:669-76.
25. Kondoh K, Koyama H, Miyata T, Takato Y, Hamada H, Shigematsu H. Conduction performance of collateral vessels induced by vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Res* 2004;61:132-42.
26. Yau TM, Li G, Zhang Y, Weisel RD, Mickle DAG, Li R-K. Vascular endothelial growth factor receptor upregulation in response to cell-based angiogenic gene therapy. *Ann Thorac Surg* 2005;79:2056-64.
27. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. Constitutive expression of phVEGF<sub>165</sub> after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998;97:1114-23.
28. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, et al. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:982-8.
29. Giorgi M, Bertini S. Tanax (T-61): an overview. *Pharmacol Res* 2000;41:379-83.
30. Deffebach ME, Charan NB, Lakshminarayan S, Butler J. The bronchial circulation. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:463-481.

31. Shennib H, Massard G. Airway complications in lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1994;57:506-11.
32. Rabinovich JJ. Re-establishment of bronchial arteries after experimental lung lobe autotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1972;64:119-26.
33. Pearson FC, Goldberg M, Stone RM, Colapinto RF. Bronchial arterial circulation restored after reimplantation of canine lung. *Can J Surg* 1970;13:243-50.
34. Yacoub M, Al-Kattan KM, Tadjkarimi S, Eren T, Khaghani A. Medium term results of direct bronchial arterial revascularisation using IMA for single lung transplantation (SLT with direct revascularisation). *Eur J Cardio-thorac Surg* 1997;11:1030-6.
35. Nowak K, Kamler M, Bock M, Motsch J, Hagl S, Jakob H, et al. Bronchial artery revascularization affects graft recovery after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:216-20.
36. Kamler M, Nowak K, Bock M, Herold U, Motsch J, Hagl S et al. Bronchial artery revascularization restores peribronchial tissue oxygenation after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:763-6.
37. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.
38. Takeshita S, Weir L, Chen D, Zheng LP, Riessen R, Bauters C, et al. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:628-35.
39. Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest* 1996;97:469-76.
40. Khaghani A, Tadjkarimi S, Al-Kattan K, Banner N, Daly R, Theodoropoulos S, et al. Wrapping the anastomosis with omentum or an internal mammary artery

pedicle does not improve bronchial healing after single lung transplantation: results of a randomized clinical trial. *J Heart Lung Transplant* 1994;13:767-73.

41. Miller JD, DeHoyos A. An evaluation of the role of omentopexy and of early perioperative corticosteroids administration in clinical lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:247-52.

42. Lima O, Goldberg M, Peters WJ, Ayabe H, Townsend E, Cooper JD. Bronchial omentopexy in canine lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;83:418-21.

43. Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, et al. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther* 2002;6:127-33.

44. Turrentine MW, Kesler KA, Wright CD, McEwen KE, Faught PR, Miller ME, et al. Effect of omental, intercostals, and internal mammary artery pedicle wraps on bronchial healing. *Ann Thorac Surg* 1990;49:574-9.

45. Takeshita S, Rossow ST, Kearney M, Zheng LP, Bauters C, Bunting S, et al. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries following administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *Am J Patol* 1995;147:1649-60.

46. Galeano M, Deodato B, Altavilla D, Squadrito G, Seminara P, Marini H, et al. Effect of recombinant adeno-associated virus vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer on wound healing after burn injury. *Crit Care Med* 2003;31:1280-1.

47. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, et al. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 2003;92:1098-1106.



48. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994;89:2183-9.

49. Mayer E, Cardoso PF, Puskas JD, De Campos K, Oka T, Dardick I, et al. The effect of basic fibroblast growth factor and omentopexy on revascularization and epithelial regeneration of heterotopic rat tracheal isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:180-8.

50. O'Toole G, Mackenzie D, Lindeman R, Buckley MF, Marucci D, McCarthy N, et al. Vascular endothelial growth factor gene therapy in ischemic rat skin flaps. *Br J Plast Surg* 2002;55:55-58.

51. Isner JM, Losordo DW. Therapeutic angiogenesis for heart failure. *Nature Med* 1999;5:491-2.

52. Tsurumi Y, Kearney M, Chen D, Silver M, Takeshita S, Yang J, et al. Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene. *Circulation* 1997;96(Suppl 9):II-382-8.

53. Ladoux A, Frelin C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:1005-10.

54. Iizuka M, Yamauchi M, Ando K, Hori N, Furusawa Y, Itsukaichi H, et al. Quantitative RT-PCR assay detecting the transcriptional induction of vascular endothelial growth factor under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:1005-10.

55. Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett* 1995;370:203-8.

56. Losordo DW, Pickering JG, Takeshita S, Leclerc G, Gal D, Weir L, et al. Use of the rabbit ear artery to serially assess foreign protein secretion after site-specific arterial gene transfer in vivo: evidence that anatomic identification of

successful gene transfer may underestimate the potential magnitude of transgene expression. *Circulation* 1994;89:785-92.

57. Couffinhal T, Kearney M, Witzenbichler B, Chen Dongfen, Murohara T, Losordo DW, et al. Vascular endothelial growth factor;vascular permeability factor (VEGF;VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol* 1997;150:1673-85.

58. Krebs R, Tickenan JM, Nykänen AI, Wood J, Jeltsch M, Yla-Herttuala S, et al. Dual role of vascular endothelial growth factor in experimental obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1421-9.

59. Fehrenbach A, Pufe T, Wittwer T, Nagib R, Dreyer N, et al. Reduced vascular endothelial growth factor correlates with alveolar epithelial damage after experimental ischemia and reperfusion. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:967-78.

60. Brown KR, England KM, Goss KL, Snyder JM, Acarregui MJ. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L1001-10.

61. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-8.

62. Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl T, Asahara T, Bauters C, Symes J, et al. Increased expression of direct gene transfer into skeletal muscles observed following acute ischemic injury in rats. *Lab Invest* 1996;75:487-501.

63. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivela A, et al. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary VEGF gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischaemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis trial (KAT). *Circulation* 2003;107:2677-83.

64. Nagahiro I, Bassem NM, Boasquevisque CHR, Scheule RK, Patterson GA. Toxicity of cationic liposome-DNA complex in lung isografts. *Transplantation* 2000;69:1802-05.

65. Cao Y, Hong A, Schulten H, Post MJ. Update on therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Res* 2005;65:639-48.

## GLOSSÁRIO

Com o objetivo de definir claramente o significado de alguns termos técnicos mais utilizados neste texto, criamos este Glossário baseado no Dicionário Médico Stedman (25ª Edição, 1996).

**Aloenxerto** – enxerto transplantado entre indivíduos geneticamente não idênticos da mesma espécie.

**Citoquinas** – proteínas liberadas de células com efeito sobre outras células.

**DNA *naked*** – plasmídeo nu; sem vetor de transferência. Ex. um plasmídeo.

**Exon** – segmento de nucleotídeos que faz parte do gene. São separados pelos introns. É a seqüência de transcrito primário que sai do núcleo como parte do RNAm.

**Homodímero** – uma proteína composta por duas cadeias polipeptídicas idênticas na ordem, número e tipos de resíduos de aminoácidos.

**Intron** – porção do DNA entre dois exons. Não aparece no RNA após a maturação, não sendo expresso.

**Isoformas** – proteínas com funções e estrutura semelhantes, mas produtos de genes diferentes ou de splice alternativo. São tecido-específicas, usualmente.

**Luz** – espaço no interior de uma estrutura tubular.

***Mattress suture*** – sutura em “U” horizontal.

**Neovascularização** – proliferação de vasos sangüíneos no tecido que normalmente não os contém.

**Plasmídeo** - é o DNA circular extracromossômico bacteriano com sítio de expressão de betalactamase responsável pela resistência a ampicilina. Exerce a função de vetor de expressão, pois apresenta um sítio promotor, como aquele do citomegalorovírus humano, que controla a expressão da seqüência de nucleotídeos

do gene terapêutico (cDNA) que foi inserido na estrutura do plasmídio por meio de enzimas de restrição.

Promotor – região do DNA na qual a RNA polimerase liga-se antes do início da transcrição do RNA.

*Splice* alternativo – combinações variadas entre os produtos da transcrição dos exons.

Telescopagem – anastomose na qual uma das extremidades posiciona-se no interior da outra extremidade da estrutura tubular que será anastomosada.

Transcrito – produto da transcrição: RNA.

Transfecção – transferência de cDNA estranho numa célula-alvo.

Transgene – fragmento de DNA ou gene de um organismo que foi incluído no núcleo celular de outro organismo vivo.

Vetores de transferência – responsáveis pelo transporte molecular de uma seqüência de DNA de um organismo para outro. São exemplos os vírus ou as moléculas sintéticas como a lipofectamina®.

Vetores de expressão – plasmídio ou vírus que coordenam a expressão de uma seqüência de DNA inserido numa célula-alvo.

## PROJETO PILOTO

Os questionamentos referentes ao melhor modelo experimental de isquemia brônquica, às drogas anestésicas escolhidas, ao método de transfecção, à padronização da técnica de RT-PCR e à dose de phVEGF 165 a ser administrada no brônquio distal foram respondidos na fase do projeto piloto.

O projeto piloto envolveu 15 cães. Os dois últimos experimentos foram incluídos no estudo principal.

Inicialmente, resolvemos testar um modelo experimental de isquemia brônquica e autotransplante pulmonar. Entre os 10 transplantes realizados, houve oito óbitos no transoperatório: cinco animais apresentaram choque por cardiodepressão (associado a um sangramento moderado) e outros três tiveram sangramento maciço e hipovolemia. Acreditamos que a cardiodepressão ocorrida nestes animais esteve relacionada ao propofol IV (0,5-1 mg/Kg), empregado na indução e manutenção da anestesia. A partir do momento em que excluímos a droga, não houve outros casos de choque cardiogênico. Mesmo assim, abandonamos este modelo experimental.

O protocolo experimental de isquemia brônquica surgiu a partir dos estudos de Pearson et al. (*Can J Surg* 1970;13:243-50) e, mais atualmente, de Baile et al. (*Transplant Proc* 1992;24:2024-29.): a dissecação hilar circunferencial, associada a broncotomia, assegurava uma isquemia semelhante àquela encontrada nos enxertos pulmonares. Além disso, a execução de um modelo experimental de isquemia brônquica mostrou-se ideal para realização das nossas análises qualitativas e quantitativas da revascularização, uma vez que a angiogênese terapêutica não concorreu com as possíveis alterações microvasculares do processo de rejeição aguda que porventura poderiam confundir a mensuração do potencial angiogênico do protocolo de terapia gênica.

Quanto ao método de transfecção, iniciamos aplicando a solução de terapia gênica (phVEGF 165) em toda a circunferência da submucosa no brônquio distal e proximal. Entretanto, o custo de cada dose e as limitações apresentadas na infiltração da submucosa e na realização da amostragem do tecido, especialmente na região cartilaginosa do brônquio, levaram-nos a transfectar apenas a porção membranosa (posterior) do brônquio distal. Além disso, o processo de homogenização do tecido (para extração do RNA total) é facilitado e otimizado na ausência de tecido cartilaginoso.

A padronização do protocolo de RT-PCR proporcionou uma redução de 50 % no custo do experimento. Menores volumes de reagentes possibilitou uma redução no volume de solução de transcrito, mantendo a mesma qualidade no produto do RT-PCR.

A ausência de trabalhos experimentais envolvendo via aérea e angiogênese através da terapia gênica, levou-nos a estipular uma dose de phVEGF 165 a partir de estudos de angiogênese em outros tecidos isquêmicos. Considerando-se o tipo e a quantidade de tecido para transfecção, testamos doses de 15 µg a 50 µg do phVEGF 165. Doses entre 30 µg e 50 µg apresentaram resultados semelhantes na expressão gênica; desta maneira, decidiu-se pela última opção, devido à facilidade na preparação e no armazenamento.

Na imunoistoquímica, testamos três protocolos para recuperação antigênica (calor, tripsina e proteinase K) dos fragmentos incluídos na parafina. Apenas a primeira técnica resultou na presença de complexo antígeno-anticorpo visível ao microscópio óptico.

A escolha pelo corante microvascular látex baseou-se na experiência prévia durante a dissertação de Mestrado (*Asian Cardiovascular and Thoracic Annals* 2003;11:237-44).

## PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS E DIVULGAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

### *Publicações*

1. Terapia gênica com VEGF 165 na revascularização precoce do brônquio doador isquêmico canino. Revista HCPA 2005;25(S1):121.
2. Autotransplante pulmonar canino: experiência inicial. Jornal Brasileiro de Pneumologia 2004;30(S3):125.
3. Terapia gênica do brônquio doador com VEGF A no autotransplante pulmonar experimental. Jornal Brasileiro de Pneumologia 2004;30(S3):131.

### *Eventos Científicos*

1. XXXII Congresso Brasileiro de Pneumologia e Tisiologia. 13-17 de novembro de 2004. Salvador/BA. Autotransplante pulmonar canino: experiência inicial.
2. XXXII Congresso Brasileiro de Pneumologia e Tisiologia. 13-17 de novembro de 2004. Salvador/BA. Terapia gênica do brônquio doador com VEGF A no autotransplante pulmonar experimental.
3. 25º Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 12-16 de setembro de 2005. Menção Honrosa de Melhor Trabalho de Apresentação Oral da 25º Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no dia 12/09/2005. Título: Terapia gênica com VEGF-165 na revascularização precoce do brônquio doador isquêmico canino.
4. *International Symposium of Advanced Therapies 2005*. XXX Reunião da Sociedade Brasileira de Biofísica 29-30 agosto/2005. Rio de



Janeiro/RJ. Título: Terapia gênica com VEGF 165 na revascularização precoce do brônquio doador isquêmico canino.

5. *Organ Donation Congresses 8<sup>th</sup> ISODP and 5<sup>th</sup> ITCS*. 3-7 de dezembro de 2005. Gramado/RS. Título: Gene therapy with VEGF 165 in early donor bronchus revascularization in canine pulmonary auto-transplant.

6. XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS. 17-21 de outubro de 2005. Título: Terapia gênica com VEGF 165 na revascularização precoce do brônquio doador isquêmico canino.

Artigo em submissão

7. Early revascularization of ischemic bronchus with Vascular Endothelial Growth Factor Gene Therapy. Periódico: *Annals of Thoracic Surgery*.

## DESPESAS

1. Consumo total com experimentos em biologia molecular, imunistoquímica e histologia.....	R\$ 4000, 00
2. Consumo total com a cirurgia experimental e cuidado com os cães.....	R\$ 5610,00
TOTAL.....	R\$ 9610,00

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)