

ERICH VINICIUS DE PAULA

**EFEITOS MODULADORES DA GERAÇÃO DE TROMBINA
E DA TRANSFERÊNCIA GÊNICA COMBINADA DO
FGF-2 E DO PDGF-BB SOBRE A ANGIOGÊNESE E
ARTERIOGÊNESE EM MODELOS DE ISQUEMIA DA
EXTREMIDADE PÉLVICA POSTERIOR EM RATOS**

Este exemplar corresponde à versão final da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de Medicina Experimental do (a) aluno (a) **ERICH VINICIUS DE PAULA**.

Campinas, 31 de agosto de 2006.



Prof (a). Dr (a). Joyce Maria Annichino-Bizzacchi
Orientador (a)

CAMPINAS

2006

ERICH VINICIUS DE PAULA

**EFEITOS MODULADORES DA GERAÇÃO DE TROMBINA
E DA TRANSFERÊNCIA GÊNICA COMBINADA DO
FGF-2 E DO PDGF-BB SOBRE A ANGIOGÊNESE E
ARTERIOGÊNESE EM MODELOS DE ISQUEMIA DA
EXTREMIDADE PÉLVICA POSTERIOR EM RATOS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia
Médica Fisiopatologia Médica, área de
concentração em Medicina Experimental*

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. JOYCE M ANNICHINO-BIZZACCHI

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P281e	Paula, Erich Vinicius de Efeitos moduladores da geração de trombina e da transferência gênica combinada do FGF-2 e do PDGF-BB sobre a angiogênese e arteriogênese em modelos de isquemia do membro pélvico posterior em ratos / Erich Vinicius de Paula. Campinas, SP : [s.n.], 2006. Orientador : Joyce Maria Annicchino-Bizzacchi Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Terapia gênica. 2. Arteriopatias Oclusivas. 3. Isquemia. 4. Hemóstase. 5. Angiogênese. 6. VEGF. I. Annicchino-Bizzacchi, Joyce Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

Título em inglês : “Effects of thrombin generation and gene transfer of FGF-2 and PDGF-BB on therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in a rat hindlimb ischemia model”

Keywords: • Gene therapy
• Arterial Occlusive Diseases
• Ischemia
• Hemostasis
• Angiogenesis

Área de concentração : Medicina Experimental

Titulação: Doutorado em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora: Profa. Dra. Joyce Maria Annicchino-Bizzacchi

Prof Dr José Eduardo Krieger

Prof Dr Winston Bonetti Yoshida

Prof Dr Fernando Ferreira Costa

Profa. Dra. Sara Terezinha Ollala Saad

Data da defesa: 31-08-2006

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Joyce Maria Annichino_Bizzacchi

Membros:

1. Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida

2. Prof. Dr. José Eduardo Krieger

3. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

4. Prof (a) Dra. Sara Terezinha Saad

5. Prof (a) Dra. Joyce Maria Annichino_Bizzacchi

Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia Médica, área de concentração Medicina Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31.08.2006

DEDICATÓRIA

*À Mônica, meu filho Theo (e quem mais chegar).
Por me ensinarem o verdadeiro sentido das coisas.*

Ao meu co-orientador Valder Arruda, pelo apoio irrestrito em todas as etapas deste trabalho, e pela orientação que tornou este percurso ainda mais valioso do que esta chegada.

À Profa. Profa. Dra. Joyce, por ter tornado possível este percurso, e pela confiança que faz dele um novo ponto de partida.

Aos Profs. Fernando Costa e Sara Saad, pela colaboração e pela inspiração pela carreira acadêmica.

Aos amigos Margareth e Aranha pela oportunidade de trabalharmos juntos, e pela prazerosa convivência diária.

Aos amigos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Unicamp, em especial à Rosana Garcia, Willian e Ana, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

Aos amigos dos laboratórios do Hemocentro da Unicamp, em especial Mariane, Tereza, Dulcinéia, Anderson, Adriana, Heloísa e Tânia pela colaboração para a realização deste trabalho, e aos demais amigos, que pela convivência diária tornam nosso trabalho ainda mais prazeroso.

Aos amigos do Serviço de Medicina Nuclear do HC-Unicamp, em especial Fabiana, Gabriela e Raquel, pela solicitude incondicional.

Aos Profs. Ana Terezinha Guillaumon e Celso Dario Ramos, pela valorosa colaboração.

Ao Prof. Dr. Kleber G Franchini e a Marcos Corat, pelas valiosas discussões ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Aos colegas de trabalho do Hemocentro, Simone, Márcia, Gislaine, Fernanda, Malu, Vagner, Marcelo, Marques, Ângela, Acacira, Daniela, Andréa, e todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório do Prof. Valder Arruda, do Children's Hospital of Philadelphia, e em especial a Yi-Lin Liu, pela orientação no desenho e produção das construções gênicas.

A meus pais Adelgício e Regina pelo amor e dedicação incondicionais, e a meus irmãos Priscilla e Igor, por completarem (e aumentarem) esta família tão especial.

A meus amigos Leandro, Flavinho, Fernando, Luciano, Cristiano e Marcelo, por tudo o que vivemos juntos e pelas marcas que deixamos em nossas vidas.

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela Fapesp, projeto temático número 2004/13158-2

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xxxvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xli</i>
1- INTRODUÇÃO.....	45
1.1 - Doença arterial oclusiva crônica periférica.....	47
1.2 - DAOCP como alvo modelo para terapia gênica e/ou celular.....	48
1.2.1 – Limitações do tratamento da DAOCP.....	49
1.2.2 – Relação risco-benefício.....	49
1.2.3 – Características gerais da angiogênese terapêutica.....	50
1.2.4 – Modelos animais.....	52
1.3 – Desenvolvimento do sistema vascular.....	52
1.3.1 – Angiogênese pós-natal.....	59
1.4 – Angiogênese terapêutica na DAOCP.....	59
1.4.1 - Justificativa.....	59
1.4.2 – Dados pré-clínicos.....	60
1.4.3 – Dados clínicos.....	60
1.4.3.1 – Proteínas recombinantes.....	60

1.4.3.2 – Terapia gênica.....	61
1.4.4 – Efeitos adversos.....	63
1.5- Lições dos estudos clínicos e pré-clínicos de angiogênese terapêutica.....	63
1.5.1 - Necessidade de novos métodos laboratoriais de avaliação da eficácia em estudos de angiogênese em animais.....	64
1.5.2 - Indução da neovascularização fisiológica utilizando combinações de fatores pró-angiogênicos.....	64
1.5.3- Abordagem multifatorial envolvendo coagulação e angiogênese....	65
2 – OBJETIVOS.....	67
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	71
3.1 – Modelo animal de isquemia arterial periférica.....	73
3.2 - Avaliação da revascularização da pata posterior em ratos.....	75
3.2.1 - Parâmetros anatômicos.....	75
3.2.1.1 - Determinação da densidade capilar.....	76
3.2.1.2 - Determinação da densidade arteriolar.....	77
3.2.2 - Parâmetros funcionais.....	78
3.2.2.1 – Índice clínico de isquemia periférica.....	78
3.2.2.2 – Perfusão relativa.....	78
3.2.2.3 – Permeabilidade vascular.....	80
3.3 – Produção de vetores não virais.....	81

3.4 – Demonstração da expressão <i>in vivo</i> do gene repórter.....	82
3.5 - Transferência gênica.....	83
3.6 - Avaliação qualitativa da expressão dos genes terapêuticos.....	83
3.7 – Efeito <i>in vivo</i> do uso crônico de anticoagulantes.....	85
3.7.1 – Parâmetros da coagulação.....	86
3.8 – Análise estatística.....	87
4 – RESULTADOS.....	89
4.1 – A remoção cirúrgica da artéria ilíaca comum resulta em isquêmica arterial periférica grave.....	91
4.2– A cintilografia com 99mTC-sestamibi permite a distinção de parâmetros de perfusão arterial periférica.....	93
4.3 – Caracterização molecular e funcional dos cassetes para expressão gênica.....	95
4.4 – Os parâmetros da resposta angiogênica e arteriogênica à isquemia periférica grave utilizando os vetores FGF-2 e PDGF-B são comparáveis ao uso isolado do vetor VEGF-A.....	96
4.4.1 – Efeitos sobre parâmetros clínicos.....	97
4.4.2 – Efeitos sobre perfusão relativa.....	97
4.4.3 – Efeitos sobre proliferação capilar.....	99
4.4.4 – Efeitos sobre proliferação arteriolar.....	100
4.5– O uso de FGF-2/PDGF-B é superior ao VEGF-A em termos de integridade vascular e segurança da expressão gênica.....	103

4.5.1 – Padrão temporal da expressão dos genes terapêuticos.....	104
4.6 - Inibição aguda da geração de trombina compromete a indução de angiogênese pós-natal.....	106
4.6.1 – Efeito in vivo do uso crônico de anticoagulantes sobre a angiogênese no modelo de isquemia da pata posterior em ratos.....	106
4.6.2 – Anticoagulação crônica não influencia parâmetros funcionais em repouso da revascularização fisiológica.....	108
4.6.3 - A inibição da geração de trombina iniciada precocemente inibe a resposta angiogênica.....	109
5 – DISCUSSÃO.....	111
6 – CONCLUSÕES.....	125
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
8 – ANEXOS.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Azul de Evans
CA	Califórnia
cDNA	DNA complementar
CE	Células endoteliais
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação animal
CMV	Citomegalovírus
DAO	Doença arterial oclusiva
DAOCP	Doença arterial oclusiva crônica periférica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
eGFP	"Enhanced green fluorescent protein"
EUA	Estados Unidos da América
FGF	"Fibroblast growth factor"; fator de crescimento de fibroblastos
FGFR	Receptor do FGF
FII:C	Atividade coagulante do fator II
FIX:C	Atividade coagulante do fator IX
FT	Fator tissular
FVa	Fator V ativado

FVIIa	Fator VII ativado
FVII:C	Atividade coagulante do fator VII
FX:C	Atividade coagulante do fator X
FXa	Fator X ativado
HBPM	Heparina de baixo peso molecular
HIF	"Hypoxia-inducible factor"; fator induzido pela hipóxia
HPRT1	Hipoxantina fosforibosil transferase
I/N	Razão entre pata isquêmica e pata normal
ICMI	Isquemia crítica de membros inferiores
ITB	Índice tíbio braquial
ITR	"Inverted terminal repeat"
KOH	Hidróxido de potássio
LDPI	"Laser doppler perfusion imaging"
M	Molar
MA	Massachussets
MBq	mega becquerel
Mci	mili Curie
MD	Maryland

MMP	Metaloprotease de matriz
MO	Missouri
M-MLV	"Murine Moloney Leukemia virus"
NaBO₂	Metaborato de sódio
NJ	Nova Jersey
OCT	"Optimum cutting temperature"
OH	Ohio
PAR	"Protease activated receptors"; receptores ativados por proteases
PCR	"Polymerase chain reaction"; reação em cadeia da polimerase
PDGF	"Platelet-derived growth factor"; fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-R	Receptor do PDGF
pFGF2	Plasmídeo DNA com o gene do FGF-2
pGFP	Plasmídeo DNA com o gene da eGFP
pPDGFB	Plasmídeo DNA com o gene do PDGF-BB
pVEGF	Plasmídeo DNA com o gene do VEGF-A
PWT	"Peak walking time"; pico de tolerância à caminhada
r-Hirudina	Hirudina recombinante
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro

ROI	Regiões de interesse
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase-transcrição reversa
SP	São Paulo
T_{an}	Temperatura de anelamento
TG	Terapia gênica
TP	Tempo de protrombina
TP_c	Tempo de protrombina de animais controle
TP_v	Tempo de protrombina de animais tratados com varfarina
TTP_a	Tempo de tromboplastina parcial ativada
U	Unidades
VEGF	"Vascular endothelial growth factor"; fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do VEGF
ØRT	Reação sem transcriptase reversa

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1- Principais características de sistemas de vetores utilizados em TG.....	51
Tabela 2- Índice de isquemia clínica.....	78
Tabela 3- “Primers” utilizados na avaliação da expressão dos genes terapêuticos.....	85
Tabela 4- Padrão temporal de expressão dos genes terapêuticos.....	104

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Etapas do desenvolvimento do sistema vascular no embrião.....	54
Figura 2- Ações complementares do VEGF-A, FGF-2 e PDGF-BB.....	66
Figura 3- Modelo de isquemia da pata posterior em ratos.....	74
Figura 4- Ligadura e ressecção da artéria femoral de ratos Lewis.....	75
Figura 5- Determinação de regiões de interesse nas imagens obtidas por cintilografia.....	79
Figura 6- Construções utilizadas nos experimentos de transferência gênica.....	82
Figura 7- Avaliação funcional da isquemia em animais controle (modelos A e B).....	92
Figura 8- Sinais clínicos de isquemia.....	92
Figura 9- Avaliação da perfusão relativa por cintilografia com ^{99m} Tc-sestamibi	94
Figura 10- Construções utilizadas nos experimentos de transferência gênica.....	95
Figura 11- Expressão do gene repórter eGFP em músculo esquelético.....	96
Figura 12- Evolução do índice de isquemia clínica nos experimentos de transferência gênica.....	98
Figura 13- Perfusão relativa nos experimentos de transferência gênica combinada.....	99

Figura 14-	Densidade capilar nos experimentos de transferência gênica combinada.....	101
Figura 15-	Densidade arteriolar nos experimentos de transferência gênica combinada.....	102
Figura 16-	Permeabilidade capilar nos experimentos de transferência gênica combinada.....	103
Figura 17-	Avaliação do padrão temporal da expressão dos genes terapêuticos.....	105
Figura 18-	Efeitos do uso crônico de varfarina em ratos Lewis sobre parâmetros da coagulação.....	107
Figura 19-	Efeitos do uso crônico de anticoagulantes sobre a perfusão relativa.....	108
Figura 20-	Avaliação da densidade capilar nos experimentos de anticoagulação crônica.....	110



RESUMO

A doença arterial oclusiva (DAO) é a principal causa de morbidade e mortalidade em países industrializados. Com o aumento da expectativa de vida da população mundial a DAO tornou-se um problema de saúde pública também em países em desenvolvimento. O tratamento de uma das formas graves de DAO, a isquemia crítica de membros inferiores (ICMI), normalmente oferece alívio temporário e muitas vezes requer a amputação do membro afetado. No Brasil, a sobrevivência desses pacientes é comparável a algumas formas de câncer. Desta forma, a busca de estratégias terapêuticas alternativas à amputação é fundamental para estes pacientes.

Nesse estudo, nós exploramos o papel da angiogênese terapêutica induzida por terapia gênica (TG) em modelos animais ICMI. A angiogênese terapêutica se baseia na utilização de fatores de crescimento vascular sob a forma de proteínas recombinantes ou TG. A reposição de proteína deve ser mantida por períodos prolongados e normalmente requer administração sistêmica. Isto aumenta o risco de formação de vasos em locais indesejáveis como tumores ocultos ou retina. Estudos clínicos anteriores demonstraram que a indução de angiogênese terapêutica utilizando apenas um fator pró-angiogênico é eficaz. No entanto, esses estudos sugerem que integridade destes neovasos é deficiente pela ocorrência de edema de membros inferiores ou proteinúria após a monoterapia angiogênica.

Neste trabalho avaliamos a eficácia da TG combinada usando vetores não virais com os genes de dois fatores de crescimento: FGF-2 e PDGF-BB, em comparação com a transferência gênica isolada do VEGF-A. A escolha destes dois fatores deveu-se ao fato de eles atuarem em etapas distintas e complementares do processo de formação vascular: formação e estabilização dos novos vasos, respectivamente. Para este fim utilizamos o modelo de isquemia da pata posterior em ratos, e um novo método não invasivo, o ^{99m}Tc-sestamibi para avaliação da neovascularização. A expressão combinada do FGF-2 e PDGF-BB induziu a formação de neovasos com a mesma intensidade e com a mesma relevância funcional que o uso do VEGF-A isolado. No entanto, a estratégia combinada se mostrou mais atraente por induzir a formação de vasos mais íntegros, e necessitar de doses individuais 50% menores de cada gene terapêutico. Em conjunto esses dados demonstram que a TG combinada com FGF-2/PDGF-BB é eficaz e potencialmente mais segura para o tratamento da ICMI.

Com o objetivo de definir fatores que afetam a resposta angiogênica pós-natal, nós investigamos o papel da trombina durante a indução de neovasos. Animais receberam diversos inibidores da coagulação imediatamente ou após 72 horas da indução de isquemia periférica. Nós documentamos que a inibição da coagulação sangüínea na fase aguda da isquemia diminui a resposta angiogênica, mas esse efeito não é observado quando a anticoagulação é iniciada após 72 horas. A ativação dos receptores celulares da trombina (e outras proteases) pode oferecer um novo alvo para otimizar a resposta angiogênica pós-natal.

Em conjunto, os resultados obtidos formam a base para estudos futuros utilizando a TG combinada com FGF-2/PDGF-BB como uma alternativa potencialmente eficaz e segura para tratamento da ICMI.



ABSTRACT

Arterial occlusive disease (AOD) is the main cause of mortality and morbidity in industrialized countries. Global improvements in life expectancy have turned it into a public health problem in developing countries as well. The treatment of one of the severe presentations of DAO, which is critical limb ischemia (CLI) normally offers temporary relief to symptoms, often requiring major amputations of the affected limb. In Brazil, the prognosis of CLI is similar to that of some forms of cancer. Therefore, new therapeutic strategies alternative to amputations are necessary for these patients.

In the present work we evaluated the role of therapeutic angiogenesis induced by gene therapy (GT) in animal models of CLI. Therapeutic angiogenesis consists in the use of vascular growth factors by means of recombinant proteins or GT. When using protein formulations, therapy must be maintained for prolonged periods and normally involves systemic administration. These requirements increase the risk of inducing the formation of neovessels in undesired places such as occult malignant lesions or retina. Previous studies have demonstrated that therapeutic angiogenesis using a single pro-angiogenic factor is effective. However, these studies suggest that the new formed vessels are leaky, as evidenced by the occurrence of lower limb edema and proteinuria after pro-angiogenic monotherapy.

In the present work we evaluated efficacy of a combined GT strategy using non-viral vectors expressing two vascular growth factors: FGF-2 and PDGF-BB, and compared this strategy to the gene transfer of VEGF-A alone. The choice of these two growth factors was due to their complementary roles in the process of vascular development: formation and stabilization of new vessels. In order to do so we used a hindlimb ischemia model in rats, and a new non-invasive method based on ^{99m}Tc-sestamibi scintigraphy, to evaluate the neovascularization response. Dual gene transfer of FGF-2 and PDGF-BB using non-viral vectors was able to induce a similar revascularization response as VEGF-A alone, both in terms of anatomical and functional parameters. In regard to safety, the dual gene transfer strategy was more attractive because it was able to induce more stable capillaries, and required a 50% lower individual dose of each therapeutic gene. Taken together our data demonstrate that this dual gene transfer strategy is an effective safer strategy for the treatment of CLI by therapeutic angiogenesis.

In order to investigate factors that might affect the revascularization post-natal response, we further investigated the role of thrombin during the induction of neovascularization. Animals were treated with different coagulation inhibitors immediately after or 72 hours after the creation of hindlimb ischemia in rats. We documented that the inhibition of blood coagulation in the acute phase of ischemia impairs the angiogenic response. In contrast, this effect was not observed when anticoagulation was initiated after 72 hours of ischemia. The activation of cellular receptors of thrombin and other proteases might therefore offer a new target to optimize post-natal revascularization.

Based on our results, future studies using combined GT with FGF-2 and PDGF-BB are warranted in order to translate these findings into a new and safer strategy for the treatment of CLI.



1- INTRODUÇÃO

1.1-Doença arterial oclusiva crônica periférica

A doença arterial oclusiva (DAO) é a principal causa de morbidade e mortalidade em países industrializados a despeito da adoção de medidas preventivas ao longo das últimas décadas, e representa um problema de dimensões crescentes para países em desenvolvimento (Gales-Camus et al., 2005). A maioria das mortes atribuídas à DAO ocorre em países em desenvolvimento, com o agravante de ocorrerem em uma faixa etária mais precoce, resultando em um impacto sócio-econômico ainda mais significativo (Beaglehole et al., 2003). Clinicamente a DAO engloba o infarto agudo do miocárdio, acidentes vasculares isquêmicos cerebrais e doença arterial obstrutiva crônica periférica (DAOCP). Frente a seu caráter emergente e ao acometimento de faixas etárias produtivas, vultuosos investimentos em programas preventivos e terapêuticos são realizados anualmente.

DAOCP é definida como a obstrução do fluxo sanguíneo arterial fora da circulação cerebral e cardíaca (Garcia LA, 2006). Quando acomete a circulação dos membros inferiores, o quadro clínico é silencioso nos estágios iniciais, podendo haver manifestações de claudicação intermitente quando a obstrução do fluxo sanguíneo chega a 50% do normal. Estima-se que entre 15 e 20% de pacientes com claudicação intermitente evoluirão para isquemia crítica de membros inferiores (ICMI) (Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia, 1991; Dormandy J et al., 1989). A ICMI pode ser definida pela presença de (1) mais de duas semanas de dor em repouso necessitando do uso regular de analgésicos ou (2) presença de úlcera sem cicatrização ou gangrena de extremidades, associada à demonstração objetiva de hipoperfusão: pressão sistólica $\leq 50\text{mmHg}$ no tornozelo ou $\leq 30\text{mmHg}$ no hálux.

Estudos epidemiológicos revelam que a ICMI ocorre em aproximadamente 500 a 1.000 indivíduos por milhão por ano, e que resulta em 150 a 250 amputações/ano por milhão de habitantes (Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia, 1991). O prognóstico destes pacientes pode ser comparado ao de algumas neoplasias malignas, mostrando taxas de sobrevida global abaixo de 50% em 5 anos (Dormandy JA e Thomas, 1988). Um estudo recente revela que nos EUA, apesar de uma

tendência de queda, mais de 111.000 amputações por ICMI foram realizados em 2003, com uma mortalidade peri-operatória acima de 6% (Nowygrod et al., 2006). No Brasil, um estudo retrospectivo estimou em 44% a mortalidade no primeiro ano após uma amputação, com sobrevida abaixo de 35% em cinco anos (de Godoy et al., 2005). Fatores étnicos e sócio-econômicos também influenciam o prognóstico de pacientes com DAOCP. Estudos populacionais revelam que amputações são relativamente mais frequentes em afro-descendentes do que em caucasianos com DAOCP (Brothers et al., 1997; Huber et al., 1999). Mais recentemente, foi demonstrado que esta associação espelha ao menos em parte a distribuição de minorias étnicas (afro-descendentes e hispânicos) nas camadas mais pobres (Wachtel, 2005). O grande contingente de afro-descendentes, as dificuldades sócio-econômicas históricas na população brasileira, e a falta de uma infra-estrutura adequada para a reabilitação são potenciais agravantes do impacto sócio-econômico da ICMI em nosso meio. Em conjunto, esses dados mostram a importância da busca de terapias alternativas à revascularização para salvamento do membro para estes pacientes.

1.2 - DAOCP como alvo modelo para terapia gênica e/ou celular

Na terapia gênica (TG), o repertório genético de células somáticas é modificado com objetivos terapêuticos. Inicialmente considerada uma fantasia que não se tornaria realidade por várias gerações, a TG humana passou dos estudos de factibilidade e segurança em animais para estudos clínicos em humanos em um ritmo que surpreenderia até seus mais ardentes defensores (Wivel e Walters, 1993). Após um período em que sua factibilidade foi severamente desafiada após a ocorrência de eventos adversos graves em humanos (Raper et al., 2003), o uso de ácido nucléicos como agentes terapêuticos voltou a ganhar força pelo relato da primeira cura utilizando a TG (Cavazzana-Calvo et al., 2000), e pelo sucesso na obtenção de níveis elevados de fator IX em pacientes com hemofilia B grave (deficiência hereditária do fator IX) (Manno et al., 2006).

Através da TG, genes de fatores de crescimento vascular podem ser injetados no músculo isquêmico, o qual funcionaria tanto como sítio de produção destas proteínas, como alvo terapêutico principal. De fato, a idéia de induzir a formação de circulação colateral como forma de tratar as complicações da DAOCP, conceito conhecido como “angiogênese terapêutica”, partiu da observação clínica e arteriográfica do desenvolvimento espontâneo de vasos colaterais preservando a função ventricular em pacientes com doença coronariana isquêmica (Habib et al., 1991). Assim ao aumentarmos a formação de vasos colaterais estaríamos apenas intensificando o que espontaneamente acontece no tecido isquêmico. Mais recentemente, a demonstração que células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea se incorporam aos vasos neoformados lançou as bases para o uso destas células no tratamento de pacientes com DAOCP (Asahara et al., 1997).

A seguir abordaremos algumas características da DAOCP que a tornam um modelo de alvo atraente para a TG.

1.2.1 - Limitações do tratamento da DAOCP

Na DAOCP, e mais especificamente entre pacientes que evoluem para ICMI, o tratamento específico (i.e., revascularização cirúrgica ou por catéter) é muitas vezes inviável, quando há doença arterial difusa ou co-morbidades que dificultam sua realização (Dormandy J et al., 1989; Isner e Rosenfield, 1993). Conforme já mencionado, estes tratamentos são frequentemente não factíveis e associados a uma taxa significativa de mortalidade (Management of peripheral arterial disease. TransAtlantic Inter-Society Consensus, 2000)

1.2.2 – Relação risco-benefício

Estima-se que cerca de 25% dos pacientes com ICMI necessitem de uma amputação maior, e que destes, 50% evoluem para óbito após o primeiro ano da amputação (Management of peripheral arterial disease. TransAtlantic Inter-Society Consensus, 2000).

No Brasil, a sobrevida em cinco anos deste grupo de pacientes com ICMI submetidos a amputação foi menor que 35% (de Godoy et al., 2005), o que é semelhante a formas agressivas de câncer. Por outro lado, a mortalidade entre quase 200 pacientes com DAO incluídos em protocolos de TG com vetores não virais não difere dos padrões observados em pacientes sob tratamento convencional, o que mostra a segurança desta estratégia (Isner et al., 2001). Em conjunto, estes dados apontam para uma relação risco-benefício favorável, justificando a investigação da TG como alternativa terapêutica para estes pacientes.

1.2.3 – Características gerais da angiogênese terapêutica.

Um dos principais entraves ao sucesso da TG nas doenças hereditárias resulta da necessidade de obtenção de expressão de níveis elevados e duradoura do gene terapêutico. Em contraste, a angiogênese terapêutica requer somente expressão transitória e em níveis relativamente mínimos comparados com o tratamento de outras doenças genéticas. Dor e colaboradores demonstraram que vasos induzidos em coração e fígado através da expressão local do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) são mantidos estáveis por longos períodos, mesmo após a abolição completa do estímulo angiogênico (Dor et al., 2002). A possibilidade de ação terapêutica com expressão transitória do gene terapêutico se torna ainda mais atraente pois minimiza os riscos de efeitos adversos indesejáveis. Estas características da angiogênese terapêutica abriram caminho da TG para DAOCP.

O principal elemento de um protocolo de TG é o vetor, que é o agente que transporta o gene para dentro das células possibilitando a expressão do gene terapêutico. De uma forma genérica não existe um vetor ideal, e a escolha do vetor para o sucesso e desenvolvimento de um programa de terapia gênica deve levar em conta principalmente a estabilidade da expressão e a segurança do vetor. Na tabela 1 são destacadas as principais características dos sistemas mais utilizados em TG.

Tabela 1- Principais características de sistemas de vetores utilizados em TG

Propriedades de diferentes sistemas de vetores				
Características	Plasmídeo	Adenovírus	AAV	Retrovírus
	DNA			
Integração genoma	Não	Não	Não*	Sim
Imunidade pré existente	Não	Sim	Sim	Improvável
Duração expressão	1 – 4 semanas	Curta	Prolongada	Prolongada
Produção	Simples	Complexa	Complexa	Complexa

AAV: vírus adeno-associado. *No fígado, predomina (>95%) a forma episômica do genoma do AAV. O restante se integra de forma randomizada ao genoma hospedeiro.

Em 1990, Wolff e colaboradores publicaram a intrigante observação que DNA ou RNA puro podem ser absorvidos e expressos por células musculares esqueléticas de camundongos sem a participação de nenhum sistema especial de transferência gênica (Wolff JA et al., 1990). Embora o mecanismo de captura do DNA pela célula alvo permaneça desconhecido (Wolff J et al., 2005), a confirmação desta observação abriu caminho para a utilização destes vetores (em geral sob a forma de plasmídeo DNA puro) na TG de doenças musculares hereditárias e adquiridas, entre as quais a DAOCP. Vetores não virais apresentam como principal vantagem o perfil de segurança, já que não apresentam risco de mutagênese insercional (não se integram ao genoma da célula alvo) (Crystal, 1995) não desencadeiam reações inflamatórias graves (ausência de resposta imune inata ao vetor) e não há imunidade prévia do hospedeiro que limite a expressão gênica (Manno et al, 2006). Além disso, os vetores não virais são de produção simples e de menor custo quando comparados aos virais. Como vantagem adicional, a musculatura esquelética é considerado um tecido-alvo atraente devido a sua elevada massa e fácil acesso que possibilita ampla aplicação clínica

1.2.4 – Modelos animais

A existência de modelos animais que reproduzem a evolução clínica da ICMI (Pu et al., 1993) permitiu a realização de estudos pré-clínicos e acelerou o desenvolvimento de protocolos terapêuticos de TG para DAOCP em humanos. Neste modelos, a isquemia da pata posterior de ratos é gerada pela exérese da artéria femoral de uma das patas. A queda do fluxo sanguíneo para níveis entre 30-50% induz uma série de mecanismos de neovascularização que permitem que ao longo de 3-4 semanas o fluxo sanguíneo em repouso atinja cerca de 60-70% dos valores basais (Scholz et al., 2002). O estudo angiográfico destes animais mostra que colaterais partindo de ramos da artéria ilíaca interna até porções distais da pata, bem como uma extensa rede de capilares nos músculos isquêmicos, são responsáveis pelo restabelecimento parcial do fluxo sanguíneo nestes membros (Takeshita et al., 1997). Ainda que este modelo não mimetize a progressão lenta da DAO em pacientes com aterosclerose, o processo de revascularização que ocorre após o estabelecimento da isquemia envolve os principais mecanismos de desenvolvimento vascular (Asahara et al., 1997; Scholz et al., 2002), e a técnica vem sendo amplamente usada como modelo para os processos de revascularização que ocorrem em músculo esquelético isquêmico.

Embora a revascularização que ocorre neste modelo esteja associada à intensa proliferação capilar, o real significado destes capilares para a perfusão efetiva permanece incerto. Desta forma, é fundamental que a avaliação da eficácia da neovascularização terapêutica envolva tanto métodos anatômicos quanto funcionais.

1.3 - Desenvolvimento do sistema vascular

O desenvolvimento do sistema vascular é um dos primeiros eventos do processo de organogênese. No embrião humano, esse processo se inicia pela migração de células do folheto mesodérmico entre o 15º e 18º dia de vida, dando origem às ilhotas sanguíneas. Nas ilhotas, duas camadas celulares se diferenciam: precursores hematopoiéticos (camada interna) e precursores das células endoteliais (CE) - angioblastos

(camada externa) (Choi et al., 1998). A diferenciação dos angioblastos em CE é chamada de vasculogênese, processo pelo qual são formados os vasos primitivos do embrião. Várias etapas posteriores são necessárias até que para formação do sistema vascular funcional. Nestas etapas, brotos vasculares surgem dos tubos pré-existentes, em um processo conhecido como angiogênese, esquematizado na figura 1. A etapa seguinte é a incorporação de células murais (pericitos e células musculares lisas) e matriz extra celular aos vasos recém formados, chamada de arteriogênese, e considerado uma etapa crítica do desenvolvimento vascular (Conway et al., 2001).

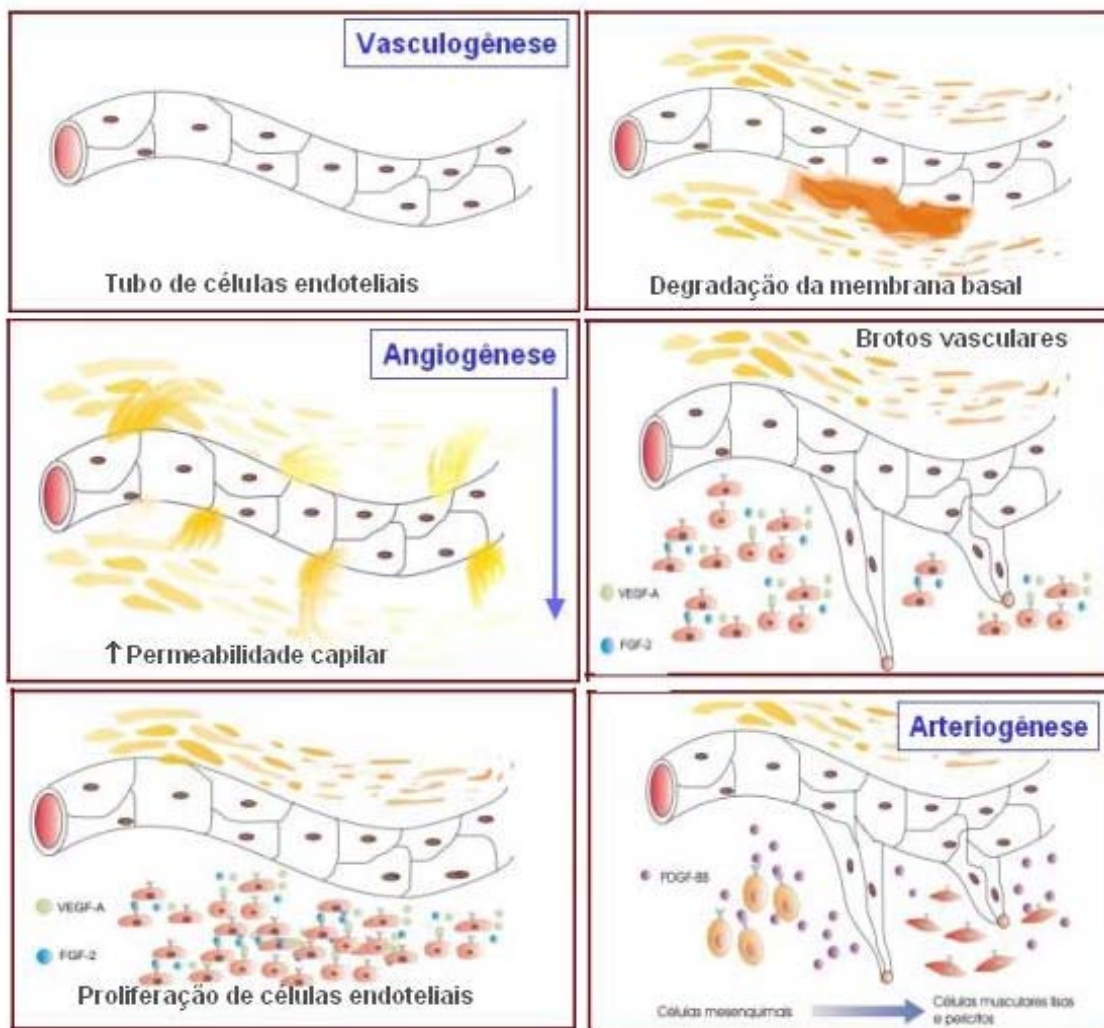


Figura 1- Etapas do desenvolvimento do sistema vascular no embrião

Figura 1- A angiogênese inicia-se a partir de tubos de células endoteliais (CE) formados pela diferenciação *in situ* e de novo de angioblastos (vasculogênese). A vasodilatação destes tubos, mediada pelo óxido nítrico, seguida por um aumento da permeabilidade vascular mediada pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) são os primeiros eventos desta cadeia, e resultam no extravasamento de proteínas para o espaço extra-celular, que funcionam como suporte para novas CE. Concomitantemente inicia-se a degradação da matriz extracelular e das ligações entre CE, que permitem a migração e o rearranjo local destas. Esta degradação decorre da ação de metaloproteases de

matriz (MMP) e permite ganho de espaço físico para CE e liberação de fatores de crescimento vascular seqüestrados na matriz. As CE então proliferam-se e migram para os sítios de formação de novos vasos ou brotos vasculares. Na etapa de arteriogênese, pericitos e células musculares lisas se associam a estes tubos vasculares dando origem a uma rede vascular funcional.

A regulação de todas as etapas descritas acima é feita através de uma complexa rede de fatores de crescimento vascular. O VEGF exerce um papel crítico em todas estas etapas. Linhagens derivadas de células tronco embrionárias com capacidade de diferenciação em CE, pericitos e células musculares lisas são caracterizadas fenotipicamente pela expressão do VEGFR-2, o principal receptor do VEGF. Além do VEGF, outros fatores são fundamentais para as etapas subseqüentes à vasculogênese, das quais dependem os processos de remodelamento necessários para a adaptação dos vasos às condições de cada órgão. Logo após a formação dos tubos endoteliais primitivos, células mesenquimais são recrutadas e organizadas em camadas para a formação de vasos maduros, um processo que depende da interação regulada entre CE e células murais. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é secretado pelas CE e seus receptores são expressos em precursores das células musculares lisas (Shinbrot et al., 1994). Sua presença é fundamental para o recrutamento dos componentes da parede vascular, fazendo dele um dos primeiros fatores identificados que atuam na comunicação entre CE e células murais (Leveen et al., 1994). As células musculares lisas estabilizam as CE impedindo sua proliferação desregulada, e dificultando sua regressão, mesmo se os estímulos para proliferação atingem níveis limitantes à sobrevivência celular (Benjamin et al., 1998). As angiopoietinas são ligantes de uma família de receptores tirosina-quinases expressos seletivamente em CE (Davis et al., 1996). O papel da angiopoietina 1 (Ang1) está relacionado à manutenção da integridade vascular (Thurston et al., 1999) e ao recrutamento de células musculares lisas (Suri et al., 1996). A angiopoietina 2 (Ang2) parece agir como um agente desestabilizante vascular e antagonista da Ang1. Ao contrário da Ang1, expressa constitutivamente no endotélio quiescente, a expressão da Ang2 é induzida e marca os vasos tanto para proliferação quanto para a regressão, dependendo da presença ou ausência do VEGF (Maisonpierre et al., 1997). Outro componente fundamental nestes processos são as efrinas e seus receptores Eph. Nas fases iniciais do remodelamento vascular, as efrinas

B2 e B4 apresentam distribuição específica no endotélio das artérias e veias respectivamente, o que sugere um papel destas proteínas na identidade arterial e venosa (Wang HU et al., 1998).

Outra molécula importante nos processos de desenvolvimento vascular é a trombina. A trombina é uma protease essencial para a coagulação. O processo de coagulação é iniciado pelo fator tissular (FT), que normalmente se encontra separado das proteínas circulantes da coagulação, quando este entra em contato com o fator VII ativado (FVIIa) em locais de lesão vascular. O complexo FT/FVIIa ativa o fator X em fator X ativado (FXa), que tendo o fator V ativado (FVa) como co-fator, transforma a protrombina em trombina. A trombina então amplifica o processo de coagulação por vários mecanismos que incluem ativação plaquetária, ativação dos fatores V, VIII, XI e XIII da coagulação, que levam à formação de trombos de fibrina e plaquetas. A ativação plaquetária mediada pela trombina ocorre através de sua ligação a receptores ativados por proteases (PARs) na superfície plaquetária (Coughlin, 2000). Curiosamente, camundongos com deficiência de PAR-1 apresentam letalidade embrionária próxima a 50% na fase do desenvolvimento do sistema vascular, associada a sangramento no embrião e anormalidades nos vasos primitivos (Connolly et al., 1997). O fato de estes animais apresentarem função plaquetária normal e de estas alterações poderem ser revertidas pela expressão transgênica do PAR-1 em CE (Griffin et al., 2001) demonstra a participação da trombina na estabilização dos novos vasos durante a angiogênese, por uma via independente de sua ação na coagulação. Não surpreendentemente, camundongos com deficiência de outros fatores envolvidos na geração de trombina como o fator tissular (FT), protrombina e fator V apresentam fenótipo semelhante com letalidade embrionária durante o desenvolvimento vascular (Bugge et al., 1996; Carmeliet et al., 1996; Toomey et al., 1996; Xue et al., 1998).

Dessa forma, coagulação e angiogênese podem ser vistas como sistemas que atuam em conjunto na interface entre CE e células sanguíneas com o objetivo comum de manutenção da estabilidade vascular e reparo de lesões endoteliais, de modo que a ativação da coagulação implicaria necessariamente na ativação – via trombina e PARs - de sinais pró-angiogênicos. Esta função celular da trombina pode estar relacionada a várias de suas

funções já demonstradas em experimentos *in vitro* tais como aumento da expressão de HIF-1 α , VEGF e seus receptores (Huang et al., 2001; Tsopanoglou e Maragoudakis, 1999), Ang2 (Huang et al., 2002), ativação de MMPs (Zucker et al., 1995), e estímulo à proliferação e migração de CE (Caunt et al., 2003).

A seguir detalharemos algumas características dos fatores de crescimento vascular utilizados em nossos estudos.

“Fibroblast growth factor” (FGF): em 1971 Folkman e colaboradores descreveram um fator angiogênico a partir de células de carcinoma Walker 256 em ratos (Folkman et al., 1971). Desde então, 22 membros relacionados à família do FGF já foram identificados (Itoh e Ornitz, 2004). Dentre estas isoformas, o FGF-1 e FGF-2 são capazes de induzir em CE várias mudanças fenotípicas que recapitulam etapas importantes do processo de desenvolvimento do sistema vascular (Bastaki et al., 1997) que incluem proliferação e migração de CE e ativação de MMPs entre outras (Presta et al., 2005). *In vivo*, o efeito pró-angiogênico do FGF-1 e FGF-2 foi demonstrado pela infusão exógena do FGF e pelo efeito inibitório de anticorpos anti-FGF-2 em um modelo clássico de angiogênese (Presta et al., 2005).

“Vascular endothelial growth factor A” (VEGF-A): descoberto há 20 anos, o VEGF-A foi inicialmente descrito como um fator secretado por linhagens celulares de carcinoma que aumentava a permeabilidade de vasos da pele e induzia a formação de ascite (Senger et al., 1983). Mais tarde vários grupos demonstraram que a ação deste fator era mais abrangente e induzia a proliferação, migração e formação de estruturas tubulares de células endoteliais (Ferrara et al., 2003). O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica que ocorre naturalmente em pelo menos seis isoformas distintas contendo 121, 145, 165, 183, 189 e 206 aminoácidos, como resultado de "splicing" alternativo (Tischer et al., 1991). As formas secretadas do VEGF-A são VEGF-A 121, 145 e 165, ao passo que as isoformas VEGF-A 183, 189 e 206 encontram-se seqüestradas por moléculas da matriz extracelular (Houck et al., 1991). A expressão do VEGF-A ocorre, entre outros estímulos, em resposta à hipóxia (Shweiki et al., 1992). Atualmente é reconhecido que a hipóxia induz a expressão e ligação do HIF-1 α a uma região promotora do gene VEGF-A, levando ao aumento de sua

transcrição. (Kimura et al., 2000). A ação do VEGF-A é mediada pela sua ligação com receptores transmembrana tirosino quinase específicos – VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. O VEGFR-2 é o principal receptor do VEGF-A nas CE, sendo também expresso em CE progenitoras circulantes (Veikkola et al., 2000).

O papel central do VEGF-A no desenvolvimento vascular foi explorado no período embrionário pelo método de "knockout" gênico. Camundongos homozigotos para deficiência do gene do VEGFR-1 (-/-) não desenvolvem precursores hematopoiéticos ou do sistema vascular, característica esta associada a letalidade embrionária (Shalaby et al., 1995). O mesmo ocorre com animais homozigotos para deficiência de VEGF-A (Carmeliet et al., 1997). Além disso, em uma observação incomum, a heterozigose para o gene do VEGF (+/-) determinou a mortalidade de todos os animais, o que indica a necessidade de concentrações ideais do VEGF para a formação vascular (Carmeliet et al., 1997). O papel de pequenas variações nas concentrações de VEGF na angiogênese pós-natal ainda não está estabelecido.

“Platelet-derived growth factor” (PDGF): a família de fatores PDGF, descoberta em meados dos anos 70 (Ross et al., 1974), é composta por cinco isoformas de homodímeros ou heterodímeros (PDGF-AA, BB, CC, DD, AB). Dentre todas as isoformas, o PDGF-BB, através de sua ligação com o receptor PDGF-R β é quem apresenta atividade pró-angiogênica mais significativa (Battegay et al., 1994), ainda que menos intensa que a do FGF ou VEGF (Heldin e Westermark, 1999). Durante a angiogênese, o PDGF-BB é secretado pelas CE, enquanto o receptor PDGF-R β é expresso nas células murais. A interação ligante-receptor, facilitada pela relação física obrigatória entre os dois, induz a proliferação e migração de pericitos e células musculares lisas durante o processo de maturação vascular. A importância deste processo no desenvolvimento vascular fica clara a partir da demonstração que camundongos “knockout” para PDGF-BB ou seu receptor PDGF-R β apresentam fenótipo semelhante caracterizado por letalidade perinatal devido a mal-formações vasculares, atribuídas à ausência de pericitos e células musculares lisas (Leveen et al., 1994; Soriano, 1994). Esta ausência traz como consequência hiperplasia endotelial, junções intercelulares anormais, e dobras excessivas na membrana basal (Hellstrom et al., 2001). Além disso, não apenas a presença, mas os níveis de PDGF-BB

são críticos para o desenvolvimento normal das células murais, na medida em que camundongos heterozigotos para o alelo PDGFB +/- apresentam uma redução significativa no número de pericitos (Hammes et al., 2002).

1.3.1 - Angiogênese pós-natal

São freqüentes as situações em que a angiogênese ocorre na vida pós-embrionária. Em situações fisiológicas, exemplos clássicos incluem o ciclo ovulatório (formação e regressão do corpo lúteo) e o processo de cicatrização de feridas. Além disso, várias situações patológicas estão associadas ao aumento da angiogênese, tais como a inflamação, adaptação à isquemia, retinopatia proliferativa e o crescimento e disseminação de tumores (Carmeliet, 2003). A visão corrente do processo de crescimento vascular pós-natal baseia-se na premissa que muitos dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário do sistema vascular são recapitulados no período pós natal.

1.4 - Angiogênese terapêutica na DAOCP

1.4.1 - Justificativa

Para que a angiogênese terapêutica se justifique do ponto de vista teórico, pelo menos uma das duas condições a seguir devem ser verdadeiras: (1) a presença de níveis diminuídos de fatores de crescimento vascular em tecidos isquêmicos, ou (2) a possibilidade de otimização da resposta endógena à isquemia pela utilização de doses supra-fisiológicas destes fatores. Em relação à primeira hipótese, Schultz e colaboradores demonstraram uma correlação positiva entre a expressão de VEGF-A estimulado pela hipóxia de monócitos e o número de colaterais no miocárdio de pacientes com isquemia coronariana crônica (Schultz et al., 1999). Na mesma linha, coelhos e camundongos senis apresentam resposta angiogênica subnormal, atribuída a níveis diminuídos de VEGF-A nos tecidos isquêmicos. A suplementação com VEGF-A reverteu a resposta subnormal nos animais senis (Rivard et al., 1999). Em contrapartida, níveis elevados de VEGF-A já foram

descritos no soro de pacientes com angina estável (Briguori et al., 2006). Um único estudo que avaliou as concentrações destes fatores em músculo e pele isquêmicos de pacientes com DAOCP encontrou níveis normais de VEGF-A, e níveis elevados de FGF-2, sugerindo uma deficiência relativa de VEGF-A nestes tecidos (Palmer-Kazen et al., 2004). Em relação à segunda hipótese, vários estudos já demonstraram que doses supra-fisiológicas de VEGF otimizam a resposta angiogênica (Post et al., 2001), e este foi de fato o racional para a maioria dos protocolos iniciais de angiogênese terapêutica. No entanto, é conveniente destacar que doses supra-fisiológicas de VEGF-A e FGF-2 também já se mostraram capazes de induzir a formação de vasos aberrantes (Ozawa et al., 2004; Sola et al., 1997), e a janela terapêutica pode ser estreita.

1.4.2 – Dados pré-clínicos

Utilizando variações do modelo de isquemia da pata posterior (Pu et al., 1993), a eficácia de fatores de crescimento vascular na indução de proliferação vascular foi demonstrada através da administração intra-arterial, endovenosa e intra-muscular de vários fatores recombinantes ou através da transferência gênica dos mesmos (Bauters et al., 1995; Garcia-Martinez et al., 1999; Shimpo et al., 2002; Takeshita et al., 1994a; Takeshita et al., 1994b; Tsurumi et al., 1996). Embora mais de uma dezena de fatores já tenha sido avaliada quanto à eficácia (Bobek et al., 2006), a maioria dos estudos utilizou VEGF ou FGF, fatores cuja eficácia está demonstrada de forma mais contundente (Khan et al., 2003). Nestes estudos, aumentos significativos no número de vasos foram obtidos, embora o significado destes aumentos para a perfusão efetiva permaneça indefinido (Yla-Herttuala e Alitalo, 2003). No conjunto, estes resultados levaram a uma relativamente rápida passagem da fase pré-clínica para estudos de fase 1 em humanos.

1.4.3 – Dados clínicos

1.4.3.1 - Proteínas recombinantes

A angiogênese terapêutica através do uso de proteínas recombinantes na DAOCP foi avaliada em um estudo de fase 2 (Lederman et al., 2002). Neste estudo duplo-cego controlado com placebo, foram comparadas a infusão intra-arterial de uma ou duas

doses (dias 1 e 30) de 30µg/kg de FGF-2 recombinante divididas nas duas artérias femorais em 190 pacientes com claudicação intermitente. O parâmetro primário de avaliação de eficácia foi a modificação do tempo máximo de tolerância à caminhada (Δ PWT) 90 dias após o tratamento. Como parâmetros secundários foram avaliados o Δ PWT após 180 dias, o tempo de início de claudicação no teste de esforço e modificação do índice tíbio-braquial (ITB) (basal comparado com dias +90 e +180), além de modificação de um questionário de qualidade de vida. Neste estudo, o uso de FGF-2 aumentou o PWT no dia +90 de 0,60 min para 1,77 min (dose única) e 1,54 min (duas doses) ($P=0,03$). No entanto, nenhuma diferença significativa pode ser demonstrada nos parâmetros secundários de eficácia. Em 2003, o uso de VEGF-A recombinante foi avaliado em um estudo de fase 2 duplo-cego controlado com placebo em pacientes com isquemia miocárdica. Neste estudo a infusão intra-coronária do VEGF-A por 20 minutos seguida por infusões endovenosas nos dias +3, +6 e +9 não resultou em nenhum benefício significativo, um resultado classificado com “decepcionante” pelos autores (Henry et al., 2003; Lederman et al., 2002).

1.4.3.2 - Terapia gênica

Em humanos, a terapia gênica na angiogênese terapêutica foi utilizada pela primeira vez em 1994 em um paciente com ICMI, que recebeu uma injeção intra-arterial (distal à obstrução) de plasmídeo-DNA contendo o cDNA do VEGF-A (pVEGF) (Isner et al., 1996). Os autores relataram melhora angiográfica após 12 semanas que, associadas ao desenvolvimento de angiomas e edema unilaterais, sugeriam um efeito biológico do tratamento. O primeiro estudo de fase 1 sobre o tema utilizou múltiplas injeções intra-musculares do pVEGF (Baumgartner et al., 1998) em 9 pacientes com ICMI sem proposta cirúrgica. Os autores relataram aumento dos níveis de VEGF-A no soro, melhora significativa do ITB, aumento de colaterais na angiografia e melhora das lesões tróficas em 4 membros, o que pôde evitar a amputação em 3 pacientes. Como efeito adverso foi relatado edema transitório de membros inferiores em seis pacientes. Dois anos mais tarde resultados semelhantes foram relatados pelo mesmo grupo em 50 pacientes (Baumgartner et al., 2000). Subseqüentemente, outros estudos de fase 1 também sugeriram

a eficácia e segurança destas estratégias (Comerota et al., 2002; Shyu et al., 2003), dando impulso à realização de estudos de fase 2. Merece destaque o fato que entre quase 200 pacientes tratados com TG usando vetores não virais expressando o VEGF-A, a mortalidade foi semelhante à descrita em pacientes tratados de forma convencional (Isner et al., 2001), o que pode ser considerado um resultado estimulante para estudos de fase 1, em que a principal consideração é a demonstração da segurança do tratamento proposto. Mais recentemente, resultados de três estudos de fase 2 randomizados duplo-cegos foram publicados. No primeiro, 54 pacientes com DAOCP receberam o gene do VEGF-A (n=35) ou placebo (n=19) por catéter após a angioplastia. Os pacientes foram ainda randomizados para tratamento com vetor viral (adenovírus, n=18) ou não viral (lipossomos/plasmídeo-DNA, n=17). Embora tenha havido aumento significativo do número de colaterais nos dois grupos tratados em relação ao placebo, outros parâmetros de eficácia não foram modificados (Makinen et al., 2002). No segundo, 105 pacientes foram randomizados para tratamento com adenovírus com o gene do VEGF-A 121 em doses baixas, elevadas ou placebo. O tratamento - 20 injeções intra-musculares no membro isquêmico no primeiro dia do experimento - não modificou nenhum parâmetro de eficácia primário (Δ PWT) ou secundário (Δ ITB) ou melhora na qualidade de vida entre os grupos experimentais (Rajagopalan et al., 2003). No mais recente, 54 pacientes com ICMI e diabetes foram randomizados para tratamento com injeções intra-musculares de pVEGF ou placebo. O parâmetro primário de eficácia (amputação no 100º dia) não foi modificado significativamente pelo tratamento. Os autores relataram melhora significativa no ITB e nas lesões tróficas (Kusumanto et al., 2006).

Ainda que estes resultados tenham atestado a segurança, e fortalecido o potencial terapêutico da TG na DAOCP, a otimização destes protocolos (doses, fatores de crescimento/vetor, via de administração) permanece em investigação.

1.4.4 - Efeitos adversos

Dois riscos potencialmente limitantes para a angiogênese terapêutica são o desenvolvimento ou aceleração de tumores malignos e a indução de angiogênese em locais indesejados (retina de pacientes diabéticos ou lesões ateroscleróticas). Até o momento nenhuma evidência da ocorrência destes efeitos foi relatada (Isner et al., 2001).

Os efeitos adversos mais comumente relatados em estudos com angiogênese terapêutica são hipotensão, proteinúria e edema de membros inferiores. Hipotensão dose-dependente ou proteinúria ($> 1\text{g}/24\text{h}$) foram relatadas nos estudos utilizando VEGF-A (Henry et al., 2001) e FGF-2 (Cooper et al., 2001; Laham et al., 2000; Unger et al., 2000) sob a forma de proteína recombinante. Nos estudos com terapia gênica com o gene do VEGF-A, não ocorreram hipotensão e proteinúria. No entanto, edema de membros inferiores em até 30% dos pacientes foi relatado (Baumgartner et al., 2000).

1.5 - Lições dos estudos clínicos e pré-clínicos de angiogênese terapêutica

Como consequência dos resultados dos estudos de fase 2, um retorno aos estudos pré-clínicos em animais de pequeno porte se fez necessário, a fim de explorar fatores potencialmente otimizáveis em futuros estudos clínicos. Dentre estes podemos citar fatores mais genéricos como a limitação em extrapolar resultados obtidos em animais de pequeno porte para humanos, e fatores mais específicos ao contexto da DAOCP como a utilização inadequada de parâmetros de eficácia (tanto em modelos animais como em estudos clínicos), o uso de um único fator de crescimento vascular e a influência de outras drogas sobre o efeito terapêutico. O estudo destes três últimos fatores foram objeto específico de nosso trabalho e serão introduzidos a seguir:

1.5.1 – Necessidade de novos métodos laboratoriais de avaliação da eficácia em estudos de angiogênese em animais

Embora os estudos pré-clínicos e estudos de fase 1 tenham demonstrado de forma inequívoca que o VEGF-A e FGF-2 exógenos aumentam a proliferação capilar em tecidos isquêmicos, o real significado deste aumento para a perfusão efetiva permanece incerto. Desta forma, a utilização de métodos de avaliação funcional dos vasos neoformados é de fundamental importância em estudos com modelos animais. Na maioria dos estudos, esta avaliação é feita através de “doppler” tecidual, que avalia o fluxo sanguíneo cutâneo no membro isquêmico. O desenvolvimento de métodos alternativos pode facilitar a avaliação de resultados de estudos de angiogênese terapêutica.

1.5.2 – Indução da neovascularização fisiológica utilizando combinações de fatores pró-angiogênicos

A resposta natural à isquemia no músculo esquelético é provavelmente resultado da interação de vários fatores de crescimento. Assim, o uso de um único fator de crescimento pode não ser suficiente para a indução de uma resposta angiogênica eficaz em tecidos isquêmicos.

A estratégia de combinar fatores de crescimento vascular com objetivos de se obter uma resposta angiogênica mais robusta tem como racional a associação de fatores pró-angiogênicos como VEGF-A e FGF-2 com fatores pró-maturação, como Ang1 e PDGF-BB. Estas combinações, por atuarem em etapas distintas do processo de desenvolvimento vascular, teriam o potencial de induzir uma resposta mais fisiológica, formando vasos mais íntegros e com menor potencial de efeitos adversos. Nesta linha, Cao e colaboradores testaram em uma série de experimentos utilizando vários modelos de angiogênese várias combinações entre VEGF-A, FGF-2 e PDGF-BB, e demonstraram que a combinação FGF-2 e PDGF-BB era a que apresentava a melhor resposta tanto no que diz respeito ao aumento da proliferação capilar, quanto a seu potencial de indução de vasos mais íntegros (Cao et al., 2003) (Figura 2).

1.5.3 – Abordagem multifatorial envolvendo coagulação e angiogênese

Estudos de fase 1 e 2 de angiogênese terapêutica freqüentemente utilizam doses baixas dos genes terapêuticos. Por isso, o efeito de outras drogas sobre a resposta angiogênica pode justificar variações significativas nos resultados, mesmo que esta interação não seja clinicamente relevante em outros contextos. Pacientes candidatos a angiogênese terapêutica apresentam freqüentemente indicação para o uso de anticoagulantes. Nos últimos anos, várias evidências vêm demonstrando a relação entre a iniciação da coagulação e a ativação da angiogênese, e desenhando um quadro em que proteínas envolvidas na coagulação (em especial a trombina) exercem funções fundamentais no processo de desenvolvimento vascular. Desta forma, a utilização de drogas anticoagulantes durante a indução terapêutica de novos vasos tem o potencial de influenciar na resposta angiogênica.

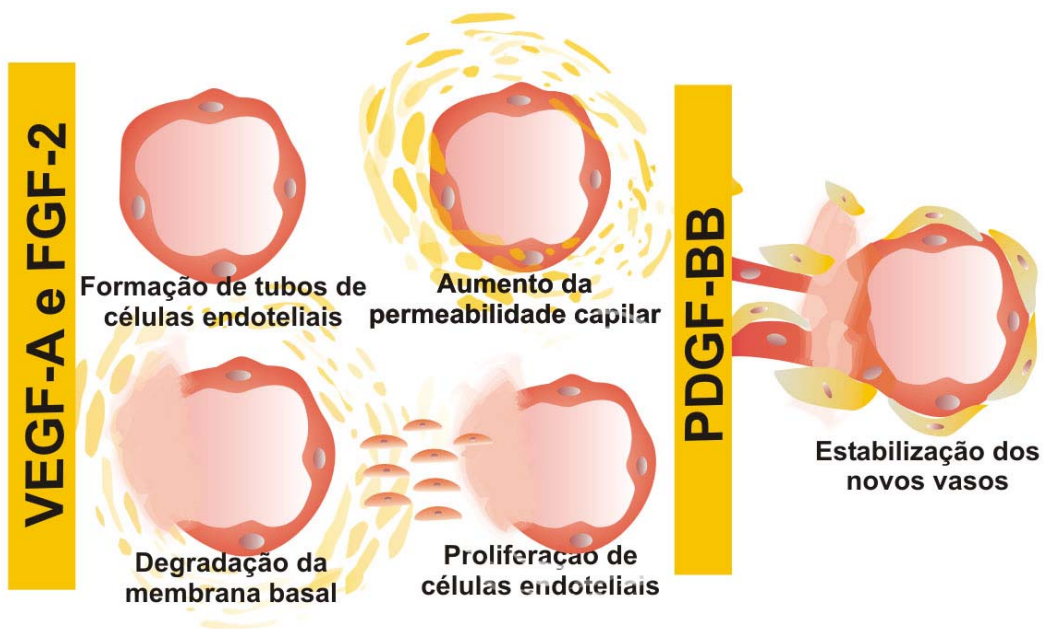


Figura 2- Ações complementares do VEGF-A, FGF-2 e PDGF-BB

Figura 2- Esquema ilustrando o papel complementar do VEGF-A e FGF-2, fatores com ação pró-angiogênica e papel nas etapas iniciais do desenvolvimento vascular, e do PDGF-BB, fator que atua principalmente nas etapas de estabilização da parede dos novos capilares através do recrutamento de células murais como pericitos e células musculares lisas.



2- OBJETIVOS

Este trabalho teve como **objetivo geral** contribuir para o desenvolvimento de uma nova estratégia de angiogênese terapêutica baseada em terapia gênica. Para este fim os **objetivos específicos** foram:

1. Avaliação dos efeitos da expressão *in vivo* de FGF-2 e PDGF-BB utilizando vetores não virais em um modelo de isquemia da pata posterior em ratos em comparação com os efeitos da expressão isolada de VEGF-A
2. Avaliação dos efeitos de drogas anticoagulantes comumente utilizadas na clínica durante a indução de resposta angiogênica pós-natal em um modelo de isquemia arterial periférica



3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Modelo animal de isquemia arterial periférica

Dois modelos de isquemia arterial periférica foram utilizados nesse estudo. O primeiro modelo (Modelo A) consistiu na ligadura e remoção cirúrgica da artéria femoral (Pu et al., 1993). O segundo modelo (Modelo B) é uma adaptação do primeiro caracterizado por isquemia mais grave na pata posterior. A isquemia mais grave é obtida pela ligadura da artéria ilíaca comum antes da remoção da artéria femoral (Paek et al., 2002). Ratos Lewis machos provenientes do Centro de Bioterismo (Cemib) da Unicamp com peso entre 250-300g foram utilizados nos experimentos. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Microprocedimentos e Pesquisa Vascular no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Unicamp, após aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Unicamp (protocolo 433-1 em 14/08/2002). Em todos os experimentos, a isquemia arterial foi criada na pata posterior direita, sendo a esquerda utilizada como controle. No modelo A, após anestesia com pentobarbital sódico 40mg/kg endovenoso (por punção da veia caudal), o pulso femoral direito foi localizado e uma incisão longitudinal feita da região inguinal até a região acima da patela com os animais mantidos em decúbito dorsal. Com o uso de material cirúrgico, a artéria femoral e seus ramos principais foram dissecados e expostos. Em seguida, utilizando-se fio cirúrgico Mersilene® (Ethicon Inc., Sommerville, NJ, EUA), procedeu-se à ligadura das artérias femoral (na sua origem imediatamente após o ligamento inguinal e em sua porção mais distal imediatamente antes de sua bifurcação em artérias poplítea e safena), e de seus principais ramos (artéria epigástrica inferior, artéria circunflexa lateral, artéria femoral profunda e artéria epigástrica superficial). Finalmente, foi feita a excisão completa da artéria femoral de modo a garantir que todo o fluxo de sangue para a pata posterior tivesse origem apenas em ramos colaterais. No modelo de isquemia grave da pata posterior (modelo B), os procedimentos descritos acima foram precedidos pela ligadura da artéria ilíaca comum direita em sua porção abdominal. Para este fim foi realizada uma incisão sagital na parede abdominal dos animais, seguida pela abertura da cavidade peritoneal. A porção distal da aorta foi então localizada com o auxílio de hastes flexíveis revestidas de algodão, e a artéria ilíaca comum direita foi dissecada e ligada. Em seguida a cavidade peritoneal e a pele foram suturadas (Figuras 3 e 4).

Analgesia pós-operatória foi realizada nos animais submetidos ao modelo de isquemia grave com meperidina 20 mg/kg subcutâneo a cada 6 horas nos 2 primeiros dias pós cirurgia associado a paracetamol 300 mg/kg/24 h diluídos na água por 4 dias. Todos os animais receberam profilaxia contra infecções com injeção intra-muscular de solução com 40.000 U de penicilina benzatina e 20.000 U de penicilina procaína (Eurofarma, São Paulo, SP). Durante todos os experimentos, animais com sinais evidentes de sofrimento foram sacrificados com pentobarbital sódico 200mg/kg endovenoso (n=9). Os animais foram mantidos em gaiolas em local com temperatura ambiente entre 22-24°C e com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro-escuro). Água e comida foram oferecidas sem nenhuma restrição.

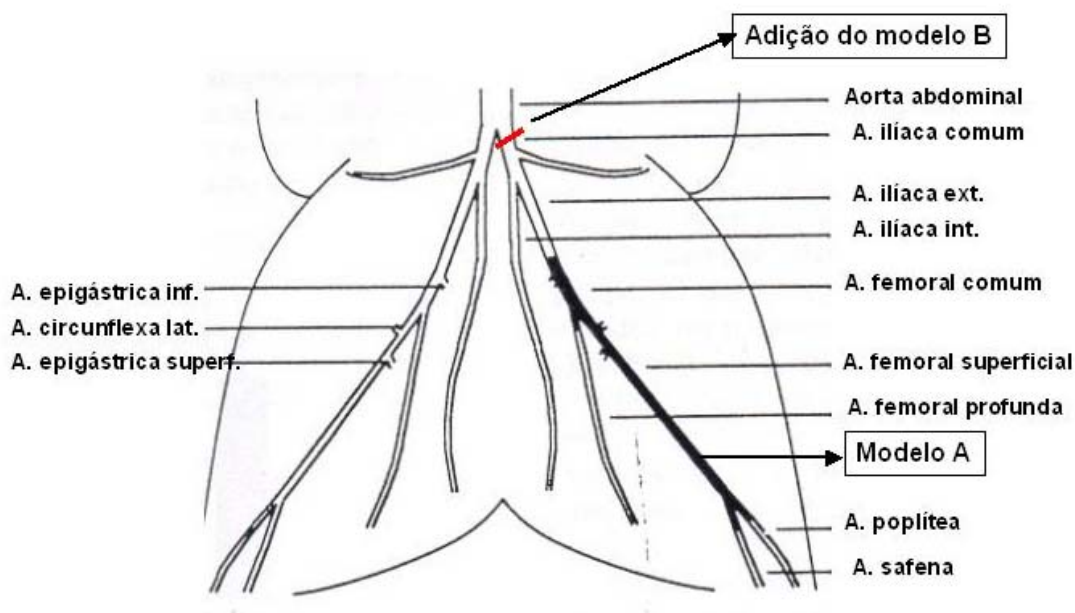


Figura 3- Modelos de isquemia da pata posterior em ratos

Figura 3- Esquema mostrando as artérias ligadas e retiradas no modelo de isquemia da pata posterior em ratos. No modelo B, além da retirada da artéria femoral destacada no esquema, é feita a ligadura da artéria ilíaca comum imediatamente após sua emergência da aorta.

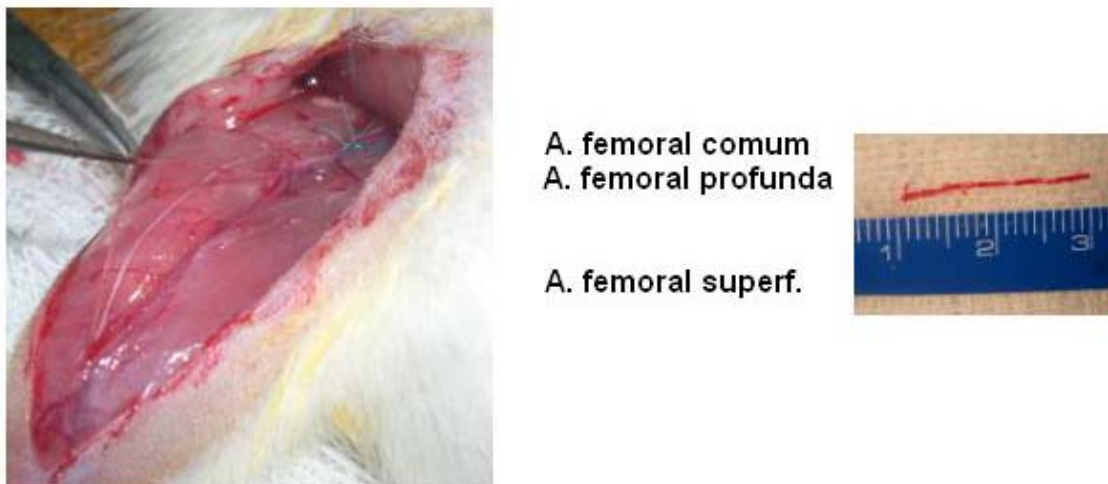


Figura 4- Ligadura e ressecção da artéria femoral de ratos Lewis

Figura 4- Imagem ilustrativa dos procedimentos cirúrgicos de dissecação e ligadura da artéria femoral comum, e o resultado final do procedimento.

3.2 - Avaliação da revascularização da pata posterior em ratos

A avaliação da revascularização da pata posterior neste modelo deve utilizar parâmetros anatômicos e funcionais. A utilização desta combinação de parâmetros torna-se ainda mais relevante em estudos de angiogênese terapêutica, na medida em que a simples presença de um número maior de vasos em um tecido não implica na funcionalidade ou relevância clínica dos mesmos.

3.2.1 - Parâmetros anatômicos

Como parâmetros anatômicos foram avaliados a densidade capilar e a densidade arteriolar. A utilização destes dois parâmetros permite uma avaliação da resposta angiogênica, caracterizada pela proliferação capilar, e arteriogênica, caracterizada pela formação de arteríolas. As amostras de tecido foram obtidas no dia +30 após a cirurgia, na pata isquêmica. Utilizando a mesma técnica descrita para ligadura da artéria ilíaca comum

direita descrita acima, os animais foram anestesiados e a aorta abdominal (em sua porção distal às artérias renais) foi isolada com fio cirúrgico Mersilene® em dois pontos. Após a ligadura do ponto proximal (levando à interrupção do fluxo para os membros inferiores), um catéter intravenoso 18G (Johnson e Johnson, Arlington, EUA) foi introduzido na aorta abdominal e os membros inferiores foram perfundidos com 10ml de uma solução de NaCl 0,9% contendo 500U/ml de heparina sódica (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil). Através de uma incisão oblíqua na porção medial da pata posterior, os músculos semimembranoso e gastrocnêmio foram identificados, isolados e coletados para análise. Estes músculos foram escolhidos para análise microscópica por serem ambos originalmente perfundidos pela artéria femoral profunda e femoral superficial respectivamente, e por serem os principais músculos da porção medial da pata posterior. As amostras dos músculos foram embebidas em resina para corte de congelamento (OCT compound, Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e congeladas em n-hexano resfriado em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas a -80°C . Para análise histológica, múltiplos cortes transversais de $7\mu\text{m}$ foram obtidos da porção central dos músculos gastrocnêmio e semimembranoso com um criostato.

3.2.1.1 - Determinação da densidade capilar

Para a determinação da densidade capilar, foi realizada a avaliação da fosfatase alcalina endógena pelo método do Indoxil-tetrazólio (Ziada et al., 1984). A fosfatase alcalina é expressa em células endoteliais de capilares arteriais, mas não em capilares venosos (Grim e Carlson, 1990). Assim, esta coloração histoquímica vem sendo extensamente utilizada para a determinação da densidade capilar em estudos em músculo esquelético (Yoshida et al., 2005).

Após breve secagem em temperatura ambiente, lâminas contendo os cortes de músculo semimembranoso ou gastrocnêmio foram coradas por 1h a 37°C em solução com a seguinte composição: nitroblue tetrazólio (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) 30mg; 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato p-toluidina sal (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) 6mg, em 30ml de um tampão contendo 6,9 mmol.litro⁻¹ MgSO_4 e 27,5

mmol.litro-1 NaBO₂ ajustado a um pH entre 9,2 e 9,4 com ácido bórico. Após enxágüe e uma breve pós-fixação com formalina (Accustain, Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EUA) tamponada com sucrose (300 mOsmol, Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, USA; 5 minutos), as lâminas foram contra-coradas com eosina 0,5%. Os cortes foram analisados sob aumento de 50X, e campos consecutivos de cada corte foram digitalizados (Kontron KS 300 V2.00 digital imaging system, Munique, Alemanha), de modo que toda a área do corte fosse incluída na avaliação (média de campos digitalizados e avaliados por corte: 8,2). Um programa de análise de imagem (Scion Image Beta 4.02 for Windows, Scion Corporation, EUA) foi usado para a contagem de capilares por corte, depois que os resultados obtidos em 10 campos aleatórios foram validados pela contagem manual. Os resultados foram expressos em capilar/mm². O número de capilares por miócito também foi calculado a fim de evitar uma superestimação da proliferação capilar em decorrência de atrofia muscular desigual entre os grupos experimentais. O número de fibras musculares foi contado manualmente em 5 campos por corte, e o número total de fibras foi estimado para cada corte. Finalmente, o número de capilares por fibra (por miócito) foi calculado.

3.2.1.2 - Determinação da densidade arteriolar

Para a determinação da densidade arteriolar, os cortes histológicos foram submetidos à secagem em temperatura ambiente e incubados com anticorpos monoclonais anti α -actina de músculo liso (clone 1A4, Dako Co., Carpinteria, CA, EUA) conjugados com peroxidase (diluição 1:1). A reação foi revelada pela adição de DAB e os cortes foram contra-corados com hematoxilina e eosina. Estes anticorpos coram células musculares lisas e permitem a identificação de arteríolas em cortes de músculo esquelético. Vasos positivos foram contados manualmente sob aumento de 20x. Os resultados foram expressos em capilares/mm².

Todas as análises anatômicas foram feitas por um observador cego para o grupo experimental de cada animal.

3.2.2 - Parâmetros funcionais

3.2.2.1 - Índice clínico de isquemia periférica

A avaliação clínica da isquemia tecidual ao longo dos experimentos foi realizada utilizando um índice de isquemia clínica previamente descrito em um modelo de isquemia da pata posterior em ratos (Paek et al., 2002) (Tabela 2). A análise foi realizada por dois observadores, sendo um deles cego para o grupo experimental ao qual pertencia cada animal. A análise foi realizada nos dias 07, 14, 21 e 28 após a cirurgia. Cada animal recebia a nota correspondente ao sinal clínico de maior gravidade (maior valor) presente em cada avaliação. Apenas as notas dadas pelo observador “cego” foram consideradas.

Tabela 2- Índice de isquemia clínica:

SINAL	NOTA
Necrose	3
Úlceras de pressão	2
Palidez cutânea ou cianose	1
Sem alterações	0

3.2.2.2 - Perfusão relativa

Cintilografia com ^{99m}Tc -sestamibi. Para avaliar a perfusão relativa da pata isquêmica nos diferentes grupos experimentais, desenvolvemos um protocolo baseado na cintilografia com ^{99m}Tc -sestamibi das patas inferiores no dia 28 pós isquemia. Neste método, a perfusão da pata contra-lateral foi usada como controle, e o valor da perfusão na pata isquêmica expresso como uma razão entre pata isquêmica e pata normal (razão I/N). A fim de validar o uso deste método nos modelos utilizados em nossos estudos, uma série de experimentos foi realizada com o objetivo de (1) avaliar a capacidade de detecção do método para pequenas variações na perfusão relativa da pata isquêmica após 28 dias do estabelecimento da isquemia e (2) validar os resultados encontrados através do método de perfusão com microesferas fluorescentes, padrão-ouro para avaliação de perfusão regional (Tsurumi et al., 1996).

Para realização das cintilografias os animais foram anestesiados como descrito anteriormente, e posteriormente injetados por via endovenosa com 55MBq (1.5mCi) de ^{99m}Tc -sestamibi. Os animais eram então posicionados sobre um suporte de madeira e fixados em decúbito dorsal com os membros inferiores esticados em posição padronizada. Após 5 minutos de circulação do radiofármaco, imagens estáticas anteriores e posteriores eram obtidas em uma câmera cintilográfica de duas cabeças para quantificação do sinal por 180 segundos. Regiões de interesse eram então desenhadas manualmente sobre a pata posterior esquerda, e aplicadas também sobre a pata posterior direita (Figura 5). A média da contagem radioativa das imagens anterior e posterior era determinada, e a razão I/N calculada para cada animal.

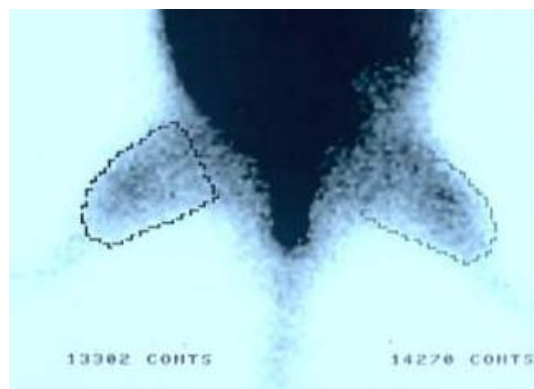


Figura 5- Determinação de regiões de interesse nas imagens obtidas por cintilografia

Figura 5- Imagem ilustrativa obtida por cintilografia com ^{99m}Tc -sestamibi mostrando o resultado do processo de determinação manual de regiões de interesse (ROI) sobre as patas posteriores. A razão I/N era obtida a partir da contagem destas regiões delimitadas.

Microesferas fluorescentes. Para determinação da perfusão da pata posterior e correlação com os dados obtidos com o ^{99m}Tc -sestamibi, microesferas fluorescentes de cor amarela com 15 μm de diâmetro (Dye-Trak, Triton Technologies Inc., São Francisco, CA, EUA) foram usadas. Esta metodologia se baseia na injeção intra-cardíaca de microesferas contendo um corante de amarelo, as quais se distribuem a partir do coração até os demais tecidos, sendo imobilizadas na circulação ao encontrarem capilares de calibre menor que 15 μm .

No 28º dia pós isquemia, quatro animais foram anestesiados como descrito previamente. Através de uma incisão na região cervical, a artéria carótida comum esquerda foi localizada, um catéter de polietileno PE50 foi introduzido até a altura do arco aórtico, e 3×10^6 microesferas foram injetadas ao longo de 6 segundos. Os animais foram sacrificados após 60 segundos com uma dose de 200mg/kg de pentobarbital endovenoso e os músculos semimembranoso e gastrocnêmio das patas isquêmica e da pata contra-lateral de cada animal foram coletados como descrito anteriormente. Amostras de cada músculo foram incubadas por 18 horas em uma solução de KOH 1M a 60º C, ou até homogeneização completa dos tecidos, e centrifugadas a 1500g por 15 minutos. Em seguida os “pellets” foram ressuspensos em uma solução de Triton (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) 10%, e sonificados para quebra de “debris” celulares. Após três ciclos de sonicação, res-suspensão e centrifugação, os “pellets” foram mantidos em temperatura ambiente por 12-18 horas para secagem completa e incubados por 15 minutos com N,N-Dimetilformamida (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) para extração do contraste fluorescente das microesferas. Após breve centrifugação a 1500g por 5 minutos, os sobrenadantes, contendo o corante fluorescente, foi avaliado em um espectrofotômetro UV1950PC (Shimadzu, Columbia, MD, EUA) para cálculo do conteúdo de microesferas de cada amostra. A relação I/N foi finalmente calculada para cada músculo com base na densidade óptica (DO) do corante extraído, de acordo com a seguinte equação:

$$(\text{DO músculo isquêmico} / \text{DO músculo normal}) \times (\text{peso em mg do músculo normal} / \text{peso em mg do músculo isquêmico})$$

3.2.2.3 - Permeabilidade vascular

A medida da permeabilidade vascular foi utilizada como um indicador indireto da integridade dos vasos neoformados nos tecidos isquêmicos. Para esta avaliação foi utilizado o método do Azul de Evans (AE) (Plante et al., 2003). Após anestesia com pentobarbital endovenoso como previamente descrito, os animais receberam injeção de 20mg/kg de AE (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) na veia caudal no 28º dia após a cirurgia. Esta data foi escolhida porque estávamos interessados nas características

funcionais a longo prazo dos vasos neoformados. Após circulação do corante AE por 10 minutos, os animais foram sacrificados como previamente descrito, e os músculos semimembranoso e gastrocnêmio das patas isquêmicas foram coletados para análise. Os músculos foram imediatamente pesados, e um terço de cada amostra foi secado a 60° por 24 horas para cálculo do peso seco. Esta medida tem como objetivo evitar a subestimação do conteúdo de AE na amostra devido a edema tissular. Os outros dois terços de cada músculo foram colocados em uma solução de formamida (4 ml/g de peso seco) por 24 horas para extração do corante. O AE extraído foi determinado por espectrofotometria a 620nm. A concentração de AE em cada tecido foi expressa em µg/g de peso seco. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de AE (0.5–25 µg/ml). Experimentos similares foram realizados em dois ratos controle sem isquemia, e os resultados do grupo experimental foram expressos como proporção dos valores obtidos nestes experimentos.

3.3 – Produção dos vetores não virais

Amostras de cDNA humanos do (1) VEGF-A 165 (gentilmente doado pela Dra. Lei Cao – Universidade da Pensilvânia, Filadélfia, PA, EUA), (2) FGF-2 (Invivogen, San Diego, CA, EUA) (3) PDGF-B (ATCC, Manassas, VA, EUA) ou do gene repórter “enhanced Green Fluorescent Protein” (eGFP) foram clonadas em cassetes de expressão idênticos. Os vetores não virais consistiram de: (a) promotor do citomegalovirus (CMV); (b) sequência intrônica sintética da β globina humana; (c) duas cópias da sequência do ITR (“inverted terminal repeat”) direito do vírus adeno-associado. O plasmídeo contendo somente o gene repórter (eGFP) foi usado no grupo controle negativo (Figura 6).

A produção dos vetores foi realizada pela transformação de células de *E. coli* DH5 α , seguida da cultura de 2-5 litros de plasmídeos contendo os distintos transgenes. A purificação dos plasmídeos foi realizada usando colunas de separação e purificação (EndoFree QiaFilter Giga Kit, Qiagen, Inc. Valencia, CA, EUA). A identidade de cada plasmídeo bem como a orientação da clonagem do transgene foi confirmada por sequenciamento direto de cada construção. Tipicamente, esse procedimento resultou em 3 a 5 mg de cada vetor, o que é suficiente para experimentos em 20-30 animais.

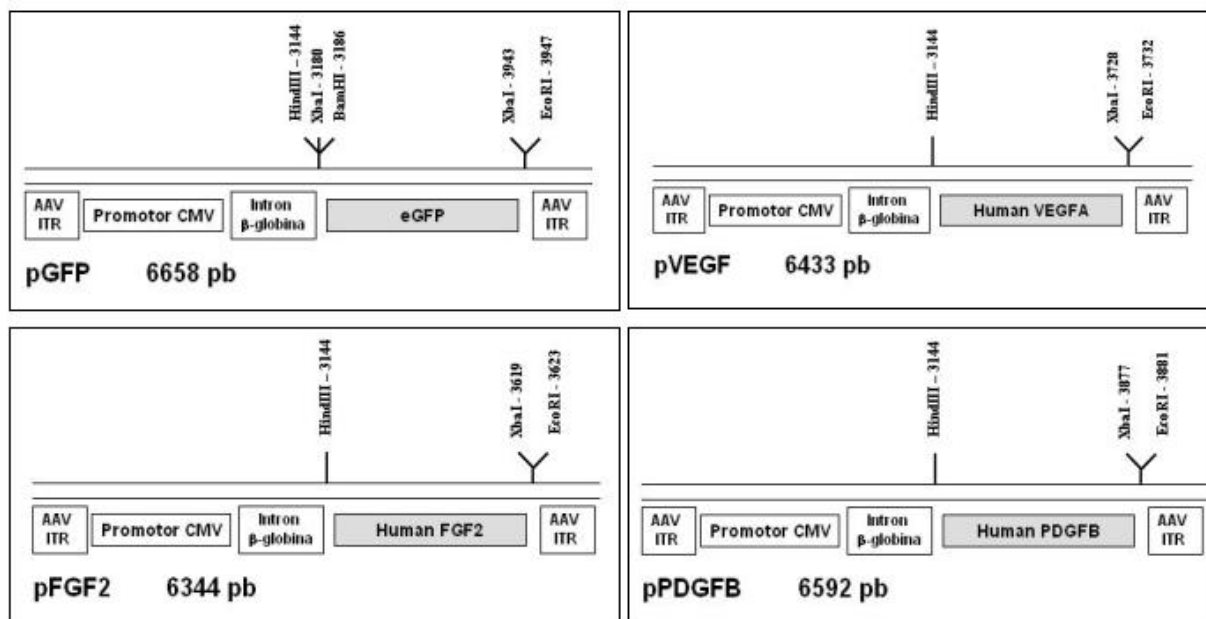


Figura 6- Construções utilizadas nos experimentos de transferência gênica

Figura 6- Esquema das construções utilizados nos experimentos de transferência gênica.

3.4 - Demonstração da expressão in vivo do gene repórter

A expressão do gene repórter eGFP foi avaliada in vivo antes do início dos experimentos com os genes terapêuticos. Ratos receberam injeção intramuscular no total de 150 µg do plasmídeo pGFP (contendo o gene eGFP) diluído em 200 µl de NaCl 0,9%. O vetor pGFP foi injetado imediatamente após o estabelecimento da isquemia na pata posterior direita, distribuídas nos músculos gastrocnêmio (6 injeções), adutores (3 injeções) e semimembranoso (3 injeções). A expressão do gene eGFP foi avaliada por microscopia de fluorescência usando o microscópio Axiovert 200M (Zeiss, Wetzlar, Alemanha) de cortes frescos (7 µm de espessura) dos músculos obtidos 3 dias após a injeção. Partículas de carbono de 40nm (Faber-Castell Corp., Newark, NJ, EUA) foram adicionadas à suspensão com o pGFP com o intuito de permitir a localização do sítio exato da injeção.

3.5 – Transferência gênica

Em seguida, foi avaliado o efeito da terapia gênica usando diferentes combinações de fatores de crescimento vascular no modelo de isquemia da pata posterior mais grave (modelo B) em ratos. Três grupos experimentais foram estabelecidos: pGFP (plasmídeo vazio; n=8), pVEGF (plasmídeo com cDNA do VEGF-A 165; n=10) e pFGF2+pPDGFB (associação de dois plasmídeos com os cDNA do FGF-2 e PDGF-B; n=10). A dose total recebida por cada animal consistiu de 150 µg de plasmídeo DNA diluído em 200 µl de solução salina. As injeções foram administradas através de agulha de calibre 25 sob visão direta imediatamente após a indução da isquemia nos músculos adutores (3 pontos), semimembranoso (3 pontos) e gastrocnêmio (6 pontos) de modo a garantir uma distribuição homogênea dos transgenes. Ratos no grupo pFGF2+pPDGFB receberam 75 µg de cada plasmídeo no mesmo volume total de salina. Durante os 30 dias de duração do experimento, os animais foram avaliados clinicamente conforme descrito anteriormente. No 28o dia de experimento os animais foram submetidos a avaliação por cintilografia com 99mTC-sestamibi, e no 30o dia foram sacrificados para avaliação de parâmetros anatômicos do tratamento.

3.6 - Avaliação qualitativa da expressão dos genes terapêuticos

Devido à potencial reatividade cruzada de anticorpos contra fatores de crescimento vascular humano e de ratos, em especial em um modelo caracterizado pelo aumento da expressão endógena destes fatores, a expressão dos transgenes humanos foi determinada através da reação em cadeia da polimerase e transcrição reversa (RT-PCR), usando “primers” de regiões não conservadas entre os genes de ratos e humanos. Para estes experimentos, animais foram sacrificados em diferentes momentos do experimento (dias +3, e +28 pós cirurgia; n=1-2 por momento). O RNA total de músculo esquelético foi extraído do músculo gastrocnêmio utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. Para este fim, amostras de 50 a 100mg de tecido foram homogeneizadas em cubas de porcelana sob resfriamento com nitrogênio líquido. Após a extração, as amostras de RNA foram estocadas a -80o C.

Para avaliação da expressão, as amostras de RNA total foram transcritas reversamente em cDNA numa reação de volume final de 50 µl contendo 3 µg de RNAm, 500 U da enzima transcriptase reversa M-MLV (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), 5 µl de primers randômicos hexâmeros (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 50 U de inibidor de RNase (RNaseOUT, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2,5 µl de dNTP mix (10mM cada) e 10 µl do tampão de reação 5x de acordo com as orientações do fabricante. Alíquotas de cDNA (1 µl) foram amplificadas por PCR em 35 ciclos de: desnaturação a 94° C (60 segundos), anelamento (temperatura na tabela 3; 60 segundos) e extensão a 72 ° C (60 segundos). Os produtos de cada PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo.

A especificidade da amplificação para os genes humanos foi confirmada por experimentos concomitantes com músculo isquêmico de ratos controle. Contaminação por DNA genômico foi evitada através do tratamento das amostra de RNA com DNAase (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA), e verificada pelo uso concomitante de controles negativos em que a enzima transcriptase reversa era omitida da reação. As características dos “primers” podem ser vistas na tabela 3.

Tabela 3 - “Primers” utilizados na avaliação da expressão dos genes terapêuticos

GENE	T _{an}	Produto PCR
<i>VEGFA humano</i>	62° C	257pb
5': GAG GGC AGA ATC ATC ACG AAG T		
3': TCC TAT GTG CTG GCC TTG GTG A		
<i>FGF2 humano</i>	52° C	374pb
5': TCA CCA CGC TGC CCG CCT TGC		
3': AGT TCG TTT CAG TGC CAC AT		
<i>PDGFB humano</i>	56° C	226pb
5': GAA GGA GCC TGG GTT CCC TG		
3': TTT CTC ACC TGG ACA GGT CG		
<i>HPRT1 rato</i>	52° C	642pb
5': AAG GAC CTC TCG AAG TGT TGG ATA		
3': CAT TTA AAA GGA ACG GTT GAC AAC G		

3.7 - Efeito *in vivo* do uso crônico de anticoagulantes

Para esta avaliação utilizamos o modelo A de isquemia da pata posterior. Nestes estudos, os animais foram alocados em três grupos experimentais caracterizados por diferentes esquemas de anticoagulação: (1) varfarina sódica (Zest Farmacêutica, Rio de Janeiro, Brasil) 0,2 mg/kg diluída em água destilada e feito por via oral do dia +3 até o dia +30 após o estabelecimento da isquemia (n=6); (2) hirudina recombinante (r-hirudina) (Lepirudin, Hoechst Marion Roussel, Kansas City, MO, EUA) 2,5 mg/kg sc do dia +1 (iniciado 6 horas após a cirurgia) até o dia +30 (n=5); e (3) heparina de baixo peso molecular (HBPM) enoxaparina (Aventis Pharmaceuticals, Inc., Bridgewater, NJ, EUA) na dose fixa de 1500U/kg sc do dia +1 (6 horas após a cirurgia) até o dia +30 após a cirurgia (n=5). Estudos preliminares com o uso da varfarina iniciada antes do procedimento cirúrgico resultaram em mortalidade inaceitavelmente alta associada a sangramento intra-operatório (n=2/2).

O alvo da intensidade da anticoagulação nos animais tratados com r-hirudina foi um tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) 1,5 a 2,5 vezes maior (4 horas após cada dose) que o tempo basal. O grupo controle (n=6) recebeu água sob as mesmas condições que o grupo tratado com varfarina. Amostras de sangue (270 µl de sangue total) foram coletadas em tubos plásticos de 1,5 ml contendo uma solução anticoagulante de citrato de sódio 3.2%, através de punção da veia caudal nos dias 7, 14, 21 e 28 para ajuste da dose do anticoagulante de ratos tratados com varfarina e ratos controle. O alvo para anticoagulação nestes animais foi um tempo de protrombina (TP) 2 a 3 vezes maior que o TP basal. Os alvos definidos para TP e TTPa foram escolhidos por estarem associados a anticoagulação adequada em várias situações clínicas. Duas amostras adicionais foram coletadas nos dias +7 e +14 de ratos tratados com r-hirudina para determinação do TTPa. No dia +30 todos os animais foram anestesiados como descrito anteriormente, e 3,5ml de sangue total foram coletados através de punção da aorta abdominal em tubos de vidro com solução de citrato de sódio 3,2%. Após centrifugação por 15 minutos a 3000g, estas amostras foram estocadas a -80°C para análise. Os animais foram então sacrificados com uma injeção endovenosa de pentobarbital 200 mg/kg, e amostras dos músculos semimembranoso e gastrocnêmio foram obtidas para análise da densidade capilar, como descrito acima.

3.7.1 - Parâmetros da coagulação

O TP foi realizado em amostras de 50 µl de plasma de cada animal misturadas com tromboplastina pré aquecida a 37°C (Simplastin Excel S, BioMérieux Inc., Durham, NC, EUA). O TTPa foi realizado em amostras de 50 µl, misturadas com 50 µl do reagente do TTPa (Platelin LS, BioMérieux Inc., Durham, NC, EUA). Ambos os testes foram realizados em um coagulômetro (Coag-A-mate MTX, Organon Teknika, Turnhout, Bélgica). A atividade coagulante do FVII (FVII:C) foi determinada em teste baseado no TP usando 50 µl de amostra misturada com 50 µl de plasma humano deficiente em FVII (Dade-Behring, Marburg, Alemanha) a 37°C. As atividades dos fatores II (FII:C), IX (FIX:C) e X (FX:C) foram determinadas em testes baseados no TTPa usando 50 µl de

amostra misturada com 50 µl de plasma humano deficiente em fator II (Diamed AG, Suíça), IX ou X: (Dade-Behring, Marburg, Alemanha), e 50 µl de reagente do TTPa. A concentração de heparina nos animais tratados com enoxaparina foi determinada através de um teste baseado na atividade anti-Xa da heparina (Accucolor Heparin, Sigma Diagnostics, St; Louis, MO,EUA).

3.8 - Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. A significância estatística das diferenças entre as médias foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney para variáveis não-paramétricas. Os valores obtidos no índice de isquemia clínica foram analisados como variáveis ordinais e as diferenças foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor do P era $\leq 0,05$.



4- RESULTADOS

4.1 - A remoção cirúrgica da artéria ilíaca comum resulta em isquêmica arterial periférica grave

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em 83 animais, conforme detalhado a seguir. Modelo A: anticoagulação com varfarina (6), controle (6), r-hirudina (5) e enoxaparina (5); óbitos intra-operatórios por sangramento (2), estudo preliminar com ^{99m}Tc-sestamibi (5) e com microesferas fluorescentes (4). Modelo B: estudo de expressão de gene repórter (2), expressão dos genes terapêuticos no dia +3 (6), tratamento por 28 dias para avaliação de parâmetros funcionais, anatômicos e expressão gênica (pGFP:9, pVEGF:8, pFGF2+pPDGFB:8, óbitos: 7), estudos de permeabilidade vascular (pVEGF:4, pFGF2+pPDGFB:4, controle não isquêmico:2). A avaliação conjunta dos dados obtidos revelaram que a remoção da artéria ilíaca resulta em um modelo de isquemia compatível com a isquemia periférica crítica de humanos.

Animais submetidos ao modelo A, em que a artéria ilíaca comum não é ligada, apresentaram sinais clínicos de isquemia caracterizados por palidez da pata posterior e marcha alterada, que revertiam completamente até o 28º dia. Animais submetidos ao modelo B apresentavam sinais graves de isquemia tecidual caracterizados por cianose acentuada, necrose das extremidades da pata posterior e úlceras de pressão em mais de 50% dos indivíduos a partir do 7º de experimento, que persistiam até pelo menos o 28º dia. Sinais de isquemia tecidual mais grave como necrose maciça com auto-amputação do membro isquêmico e/ou deiscência com infecção da cicatriz cirúrgica ocorreram em 7 animais do modelo B durante experimentos preliminares, já a partir do 3º dia. A análise funcional em animais dos grupos controle é mostrada na figura 7 e fotos ilustrativas dos sinais utilizados no cálculo do índice de isquemia clínica na figura 8.

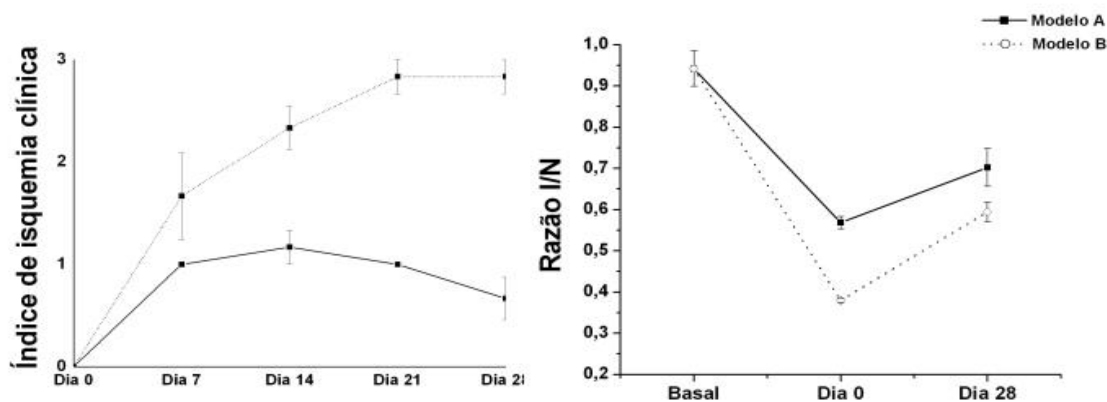


Figura 7- Avaliação funcional da isquemia em animais controle (modelos A e B)

Figura 7- Evolução dos sinais de isquemia clínica e da perfusão relativa nos animais controle dos modelos A e B, mostrando a maior gravidade do modelo B.



Figura 8- Sinais clínicos de isquemia

Figura 8- Fotos ilustrativas das alterações presentes nos animais após a indução de isquemia pelo modelo B, que eram utilizadas no cálculo do índice de isquemia clínica: A – palidez; B – Úlceras de pressão; C – necrose; D – cianose da pata direita; E – necrose da pata direita.

4.2 – A cintilografia com 99mTC-sestamibi permite a distinção de parâmetros de perfusão arterial periférica

Estudos preliminares foram realizados para validação da cintilografia com 99mTC-sestamibi como método de avaliação da perfusão relativa da pata posterior em ratos. Os resultados estão demonstrados na figura 8. Ratos (n= 5) foram submetidos ao modelo A de isquemia e avaliados através do método em investigação nos tempos “basal” (pré-cirurgia), 0 (imediatamente após a cirurgia), dia 7, dia 14 e dia 28 após a cirurgia. Os valores médios entre perfusão da pata isquêmica e normal (razão I/N) diminuíram de $0,94 \pm 0,08$ (basal) para $0,56 \pm 0,03$ imediatamente após a cirurgia ($P < 0,05$; teste de Mann-Whitney). Após 7, 14 e 28 dias, as razões eram respectivamente $0,64 \pm 0,12$ ($P < 0,05$; teste de Mann-Whitney), $0,72 \pm 0,04$ ($P < 0,05$; teste de Mann-Whitney) e $0,70 \pm 0,09$ ($P < 0,05$; teste de Mann-Whitney) (Figura 9).

Esses dados sugerem que a cintilografia com 99mTc-sestamibi é um método capaz de distinguir pequenas variações na perfusão tecidual durante os 28 dias após a isquemia, mesmo no modelo caracterizado por hipoperfusão moderada e estável. Para validação destes resultados, a perfusão relativa foi avaliada através da utilização de microesferas fluorescentes no dia 28 em 4 ratos submetidos ao mesmo modelo de isquemia. Nestes estudos, a perfusão relativa no músculo semimembranoso foi $0,69 \pm 0,13$ ($P = 0,89$; teste de Mann-Whitney), valor também compatível com hipoperfusão moderada. Assim a cintilografia com 99mTc-sestamibi oferece a oportunidade de avaliação não invasiva global de parâmetros de perfusão local comparáveis àqueles obtidos com microesferas.

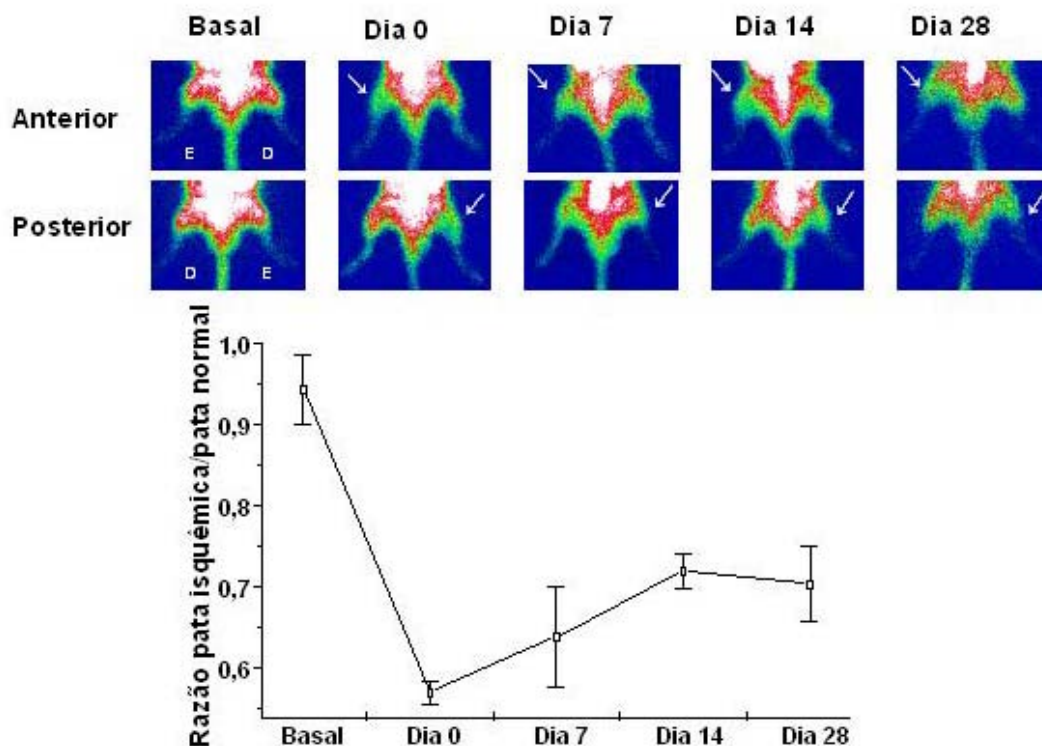


Figura 9- Avaliação da perfusão relativa por cintilografia com 99mTc-sestamibi

Figura 9- Imagens estáticas obtidas por cintilografia com 99mTc-sestamibi da pata posterior direita (D) e esquerda (E) de ratos Lewis (n=5). As cores azul e verde indicam nenhuma ou pouca perfusão respectivamente, e vermelho e branco indicam os níveis mais elevados de perfusão. A artéria femoral comum e superficial direita foi retirada no dia 0, e a pata contra-lateral foi utilizada como controle interno. Imagens anteriores e posteriores foram obtidas 5 minutos após a injeção do radiofármaco, antes da cirurgia (basal), imediatamente após (dia 0) e nos dia +7, +14 e +28 após a cirurgia. Evidente diminuição da perfusão da pata posterior direita (setas) está presente no dia 0, seguida por lenta recuperação até o dia +14. No dia 28, áreas de hipoperfusão ainda eram visíveis à cintilografia. O gráfico mostra a avaliação quantitativa destas observações em 5 animais, através da razão de perfusão entre pata isquêmica e normal (razão I/N). Valores expressos em média $\pm$ desvio-padrão. Os valores obtidos nos dias 0, +7, +14 e +28 apresentam diferença estatisticamente significativa em relação aos valores basais ($P < 0,05$).

4.3 – Caracterização molecular e funcional dos cassetes para expressão gênica.

Após a purificação dos diversos plasmídeos, a presença dos genes terapêuticos bem como sua correta localização em relação aos demais elementos dos cassetes de expressão nas respectivas construções foram confirmadas em gel de agarose 0,8% e por seqüenciamento direto (Figura 10).

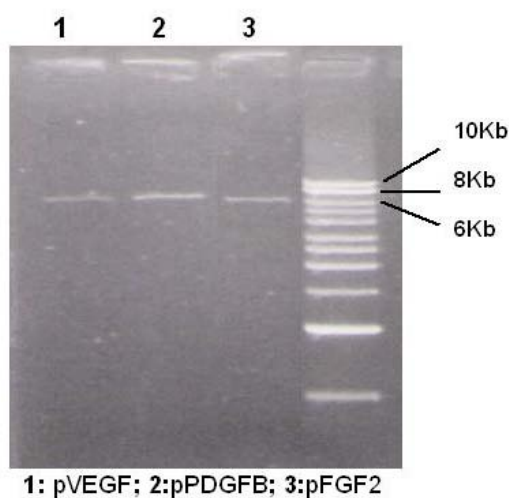


Figura 10- Construções utilizadas nos estudos de transferência gênica

Figura 10- A figura mostra as construções utilizadas nos estudos de transferência gênica identificadas pelo tamanho em gel de agarose 1%.

Para testar a viabilidade do cassete de expressão, o plasmídeo contendo o eGFP foi injetado no músculo semimembranoso isquêmico e a expressão do gene repórter foi confirmada 72 horas após. A avaliação dos cortes frescos do músculo injetado demonstrou expressão confinada à região próxima aos sítios de injeção e com positividade de aproximadamente 2 a 5 % das fibras musculares nestas áreas (Figura 11), enquanto que no mesmo músculo da perna contralateral, a expressão da eGFP foi negativa. Esses dados demonstram que esses cassetes têm a capacidade de induzir expressão in vivo em roedores.

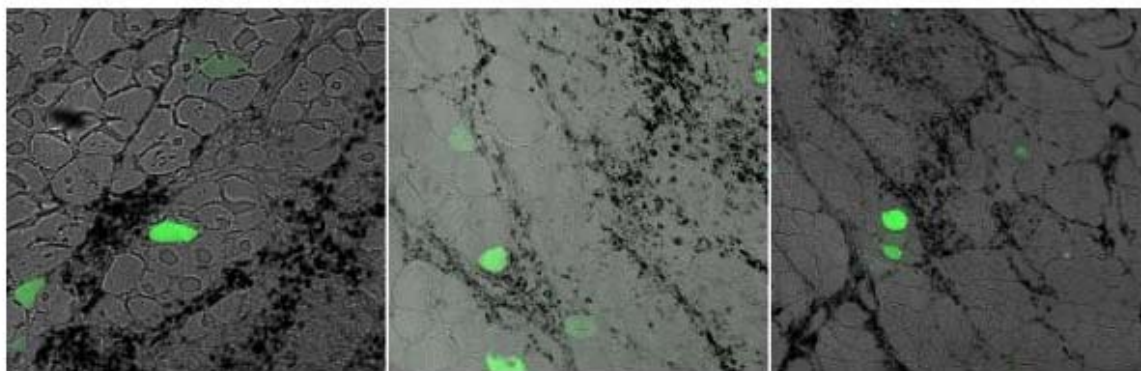


Figura 11- Expressão do gene repórter eGFP em músculo esquelético

Figura 11- Avaliação da expressão da proteína fluorescente eGFP em músculo semimembranoso de ratos Lewis 72h após a injeção IM de vetores não virais (plasmídeo-DNA). O vetor não viral utilizado nestes experimentos foi o mesmo utilizado como base para produção dos vetores com os genes terapêuticos e a injeção foi feita sob condições semelhantes às usadas nos demais experimentos de transferência gênica. Cortes frescos de músculo semimembranoso de ratos Lewis macho de 8 semanas de 7 μ m de espessura, observados sob microscopia de fluorescência mostrando a expressão da eGFP em 2 a 5% das fibras, restrita à região de injeção dos vetores. Partículas de carbono foram adicionadas aos vetores não virais para facilitar a localização exata do sítio de injeção.

4.4 – Os parâmetros da resposta angiogênica e arteriogênica à isquemia periférica grave utilizando os vetores FGF-2 e PDGF-B são comparáveis ao uso isolado do vetor VEGF-A

Esses estudos visaram a direta comparação entre a eficácia e segurança de vetores expressando FGF-2/PDGF-B ou VEGF-A. Dados de outros laboratórios mostraram que VEGF-A é um fator pró-angiogênico eficaz em vários modelos animais e em humanos, mas os vasos apresentam alta permeabilidade capilar. Nesse estudo a dose total de DNA nos dois grupos foi idêntica (150 μ g de VEGF-A versus 75 μ g de FGF-2/ 75 μ g de PDGF-B).

4.4.1 - Efeitos sobre parâmetros clínicos

Após o estabelecimento da isquemia, todos os ratos desenvolveram sinais de isquemia já no 7º dia do experimento. Estes sinais persistiram até o último dia do experimento (dia +28). Os valores obtidos através do índice de isquemia clínica foram semelhantes entre os três grupos experimentais até o dia +14. A partir do dia +21, animais tratados com pVEGF ou com a combinação pFGF2+pPDGFB passaram a apresentar uma melhora semelhante dos sinais de isquemia quando comparados aos animais tratados com pGFP. No dia +28 esta diferença era estatisticamente significativa ($P=0,03$; teste de Kruskal-Wallis). No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa pode ser demonstrada entre os grupos tratados com pVEGF ou pFGF2+pPDGFB (Figura 12).

4.4.2 - Efeitos sobre a perfusão relativa

No dia +28, quando foi realizada a avaliação da perfusão relativa, expressa pela relação I/N, animais tratados com pVEGF isolado ($I/N=0,85$) ou com a combinação pFGF2+pPDGFB ($I/N=0,97$) apresentaram valores mais elevados do que animais tratados com pGFP ($I/N=0,72$) ($P=0,04$ e $0,02$ respectivamente). No entanto, nenhuma diferença no grau de recuperação deste parâmetro pode ser demonstrado entre os grupos tratados com pVEGF e pFGF2+pPDGFB ($P = 0,29$) (Figura 13).

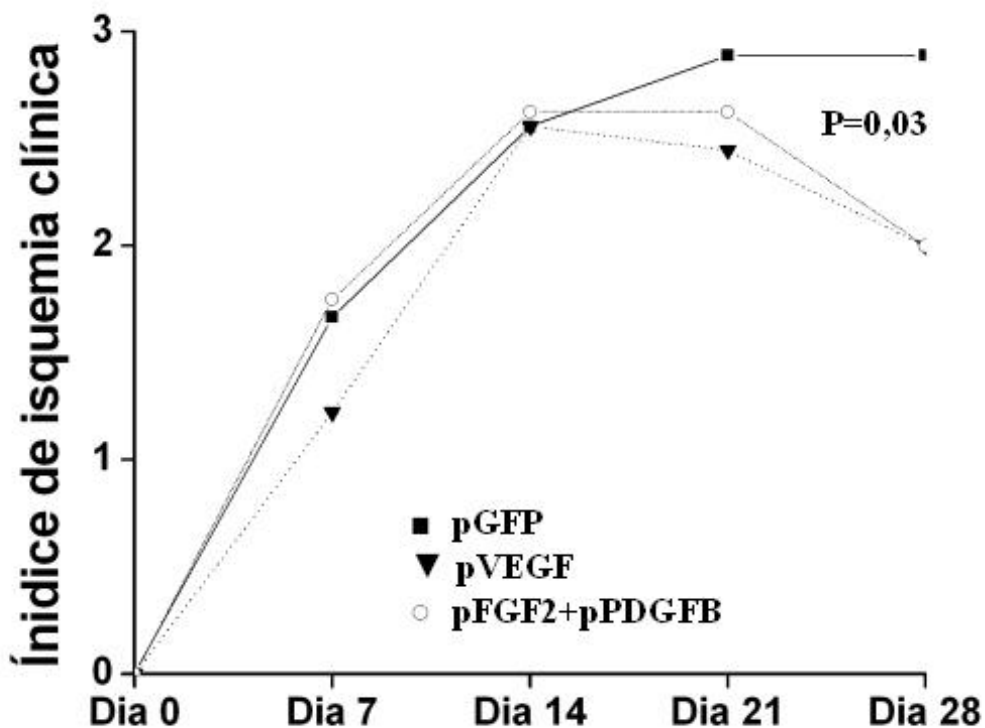


Figura 12- Evolução do índice de isquemia clínica nos experimentos de transferência gênica

Figura 12- Avaliação clínica da isquemia. Os valores mostram um padrão de recuperação semelhante entre animais tratados com pVEGF (n=8) e com pFGF2+pPDGFB (n=8), que em ambos os casos foi superior ao observado em animais do grupo controle (pGFP; n=9).

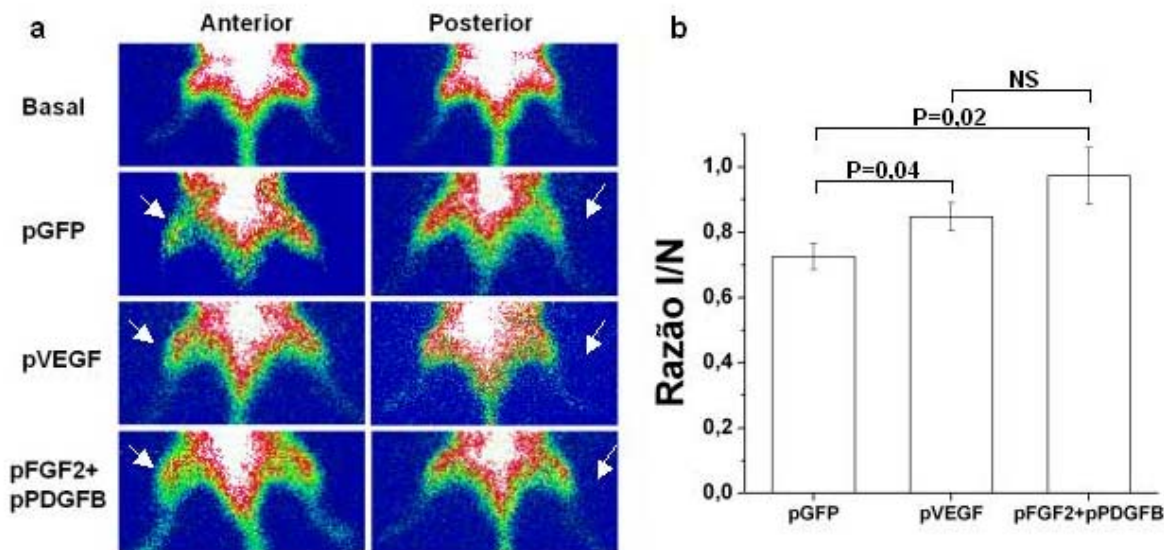


Figura 13- Perfusão relativa nos experimentos de transferência gênica combinada

Figura 13. **(a)** Imagens representativas obtidas por cintilografia com ^{99m}Tc -sestamibi por exposição anterior e posterior de animais controle antes da indução da isquemia (basal), e no dia +28 pós isquemia nos três grupos dos experimentos de transferência gênica. Cada imagem representa um animal distinto. A seta indica a pata isquêmica. **(b)** Razão I/N nos três grupos experimentais. No dia +28 após a isquemia, uma melhora significativa na perfusão relativa pode ser demonstrada nos animais tratados com pVEGF e pFGF2+pPDGFB, comparados com os controles (pGFP; n=8) ($P=0,04$ e $0,02$ respectivamente). Nenhuma diferença foi detectada entre animais tratados com pVEGF (n=7) ou com a associação pFGF2+pPDGFB (n=6) ($P=0,10$).

4.4.3 - Efeitos sobre a proliferação capilar

Os efeitos da transferência dos genes terapêuticos sobre a resposta angiogênica in vivo, representada pela proliferação de pequenos capilares na pata isquêmica, foram avaliados em dois grupos musculares distintos. A relação capilar por miócito foi também avaliada com o objetivo de corrigir eventuais imprecisões nesta avaliação em decorrência de atrofia heterogênea de fibras musculares entre os grupos experimentais. No músculo

gastrocnêmio, tanto a densidade capilar quanto a relação capilar por miócito se apresentaram elevados nos dois grupos tratados com os genes terapêuticos em comparação com o grupo tratado com pGFP. Mais uma vez, a terapia combinada apresentou resultados semelhantes ao uso do VEGF isolado. No músculo semimembranoso, embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido demonstrada entre os três grupos experimentais no que diz respeito à densidade capilar, a combinação pFGF2+pPDGFB induziu um aumento significativo na relação capilar por miócito quando comparado com pGFP ($P<0,01$). Neste músculo o tratamento com pVEGF isolado induziu um aumento menos pronunciado da relação capilar por miócito em comparação ao pGFP ($P=0,08$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa pode ser demonstrada entre os dois grupos terapêuticos (Figura 14).

4.4.4 - Efeitos sobre a proliferação arteriolar

A resposta arteriogênica foi avaliada pela determinação da densidade arteriolar, através do uso de anticorpos anti α -actina de músculo liso. A densidade arteriolar apresentou aumento significativo no músculo semimembranoso de animais tratados com pVEGF (59,98 arteríolas/ mm^2) e pFGF2+pPDGFB (55,25 arteríolas/ mm^2) em comparação com animais tratados com pGFP (32,01 arteríolas/ mm^2) ($P<0,001$). No entanto a magnitude deste aumento foi semelhante entre os dois grupos. Em contraste, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada no músculo gastrocnêmio de animais tratados com pVEGF (56,48 arteríolas/ mm^2), pFGF2+pPDGFB (58,47 arteríolas/ mm^2) e pGFP (69,32 arteríolas/ mm^2) (Figura 15).

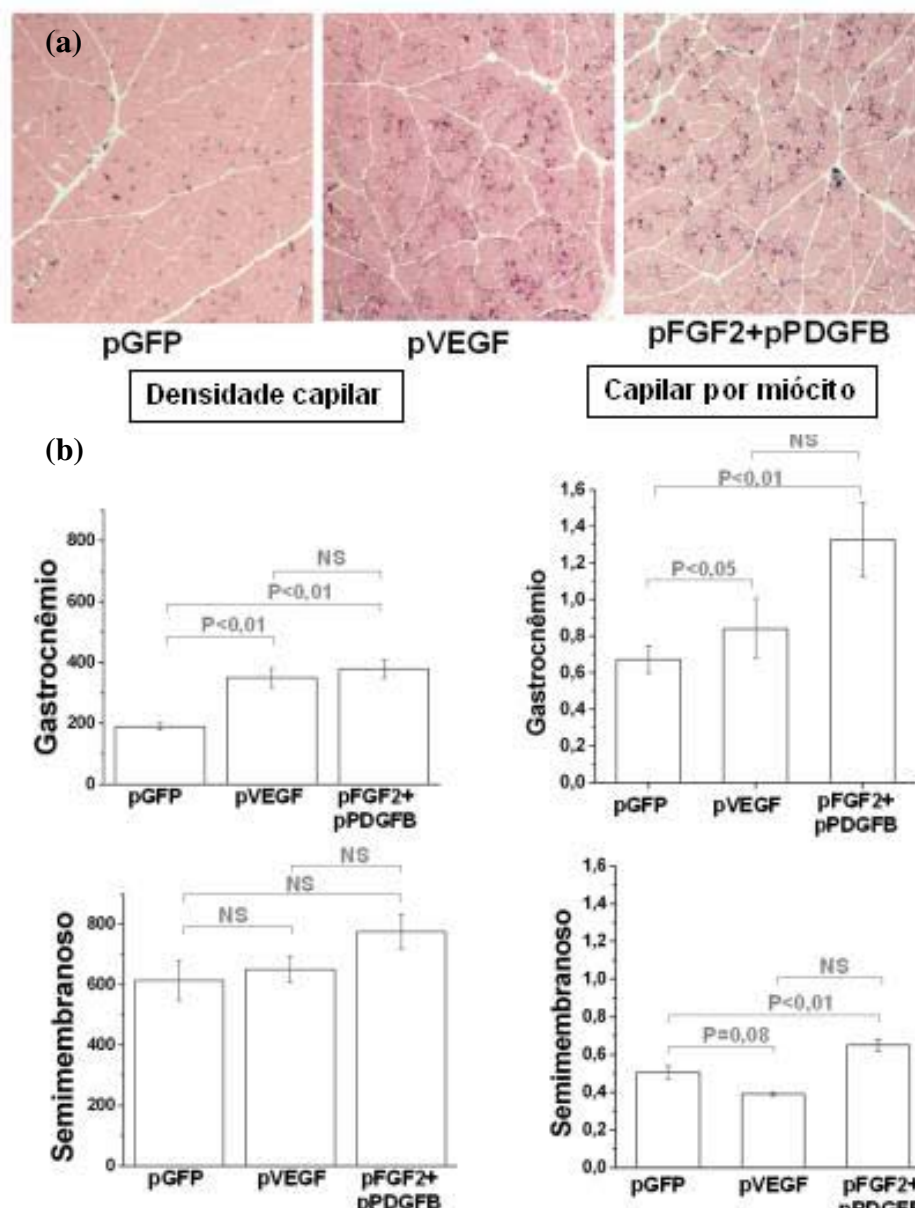


Figura 14- Densidade capilar nos experimentos de transferência gênica combinada

Figura 14. Análise histoquímica de cortes de músculo esquelético obtidos no dia +30 pós isquemia. **(a)** Microfotografias representativas do músculo gastrocnêmio isquêmico com espessura de 7 μ m de animais tratados com pGFP, pVEGF e com a combinação pFGF2+pPDGFB. Coloração para demonstração da fosfatase alcalina endógena, pelo método indoxil tetrazólio (Aumento de 100x). **(b)** A densidade capilar e capilar por miócito dos músculos gastrocnêmio e semimembranosos nos três grupos. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média; n=6 por grupo.

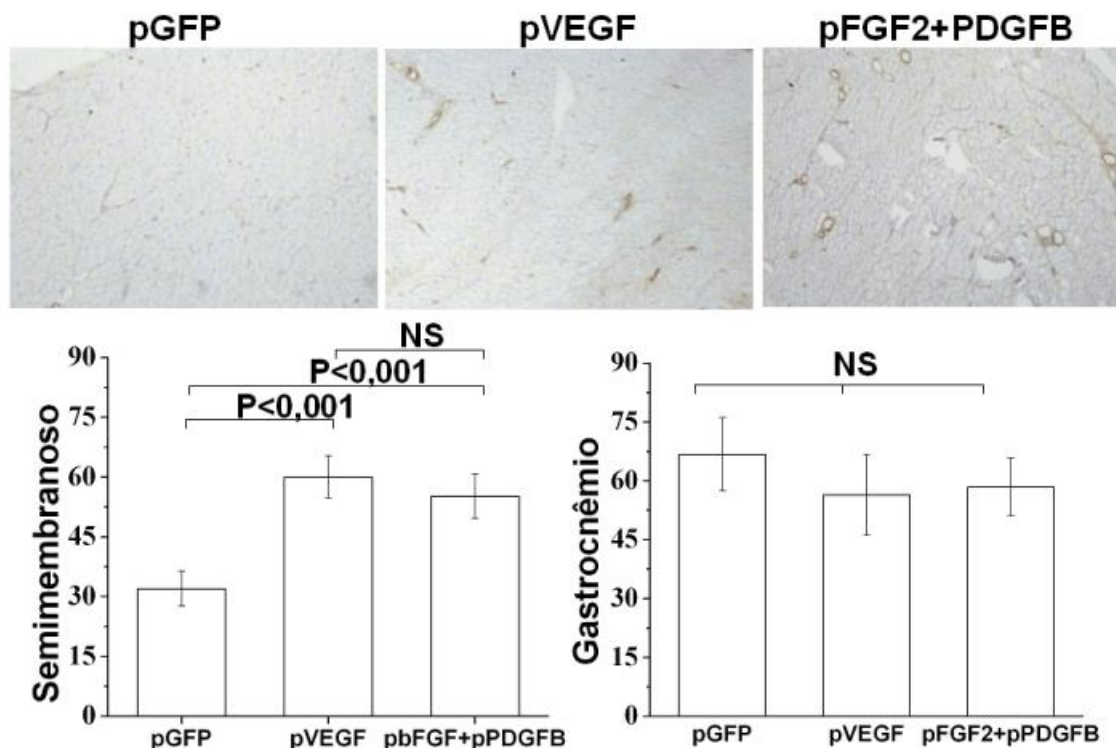


Figura 15- Densidade arteriolar nos experimentos de transferência gênica combinada

Figura 15- Análise imuno-histoquímica de cortes obtidos no dia +30 pós isquemia. (a) Microfotografias representativas de cortes dos músculos semimembranoso de animais tratados com pGFP, pVEGF ou com a combinação pFGF2+pPDGFB incubados com anticorpos anti α -actina de músculo liso (Aumento de 25x). (b) Densidade arteriolar (arteríolas/mm²) determinada por contagem manual, mostrando aumento estatisticamente significativo e de intensidade semelhante no número de arteríolas no músculo semimembranoso de animais tratados com pVEGF e com a combinação pFGF2 e pPDGFB em comparação com os animais controle (pGFP). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média; n=6 por grupo.

4.5 - O uso de FGF-2/PDGF-B é superior ao VEGF-A em termos de integridade vascular e segurança da expressão gênica

Na sequência destes experimentos, nós utilizamos a técnica do Azul de Evans para avaliação da integridade dos vasos presentes nos músculos isquêmicos de animais tratados com pVEGF ou pFGF2+pPDGFB. Nestes experimentos a análise foi novamente realizada em dois grupos musculares distintos, gastrocnêmio e semimembranoso. Em comparação a animais tratados com pVEGF, animais tratados com a pFGF2+pPDGFB apresentaram menor permeabilidade capilar, indicando a presença de vasos mais íntegros no dia +28 pós tratamento (permeabilidade capilar = 18,70 e 25,07 $\mu\text{gAE/g}$ em ratos tratados com pFGF2+pPDGFB e pVEGF respectivamente; $P=0,03$ – $n=4$ por grupo). No entanto, este efeito não ocorreu no músculo gastrocnêmio (20,31 e 20,11 $\mu\text{gAE/g}$ - pFGF2+pPDGFB e pVEGF respectivamente; $P=0,99$) (Figura 16).

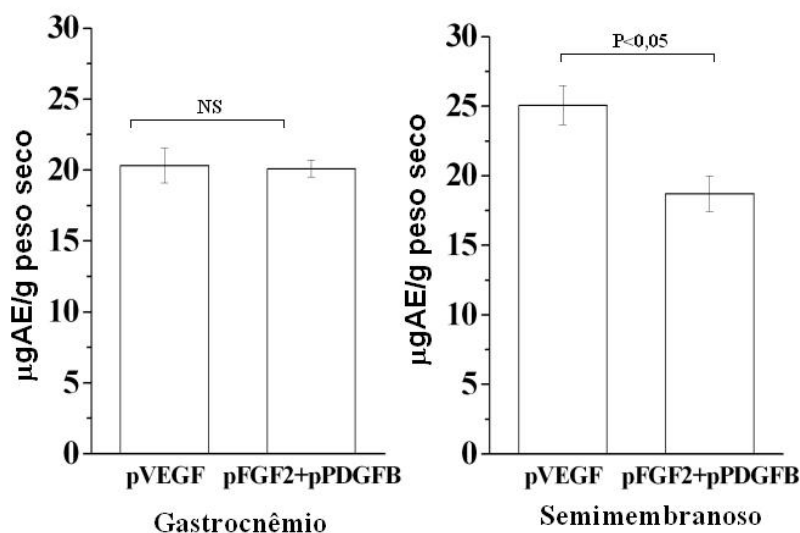


Figura 16- Permeabilidade capilar nos experimentos de transferência gênica combinada

Figura 16- A permeabilidade capilar nos músculos semimembranoso e gastrocnêmio foi estimada pelo método do Azul de Evans (AE) em animais tratados com pVEGF e com a combinação pFGF2+pPDGFB, no dia +28 pós isquemia. Os resultados estão expresso em $\mu\text{gAE/g}$ of peso seco de tecido. Em músculo semimembranoso de animais tratados com a combinação pFGF2+pPDGFB, valores significativamente inferiores foram observados ($n=4$ por grupo; $P < 0,05$).

4.5.1 - Padrão temporal da expressão dos genes terapêuticos

A expressão do RNAm do VEGF-A foi demonstrada tanto no dia +3 quanto no dia +28. Em contraste com este padrão de expressão sustentada, o RNAm do FGF-2 e PDGF-B só foi detectado no dia +3 (Tabela 4). Amostras em que a enzima transcriptase reversa foi omitida da reação de transcrição do cDNA, utilizadas com o objetivo de detectar contaminação por DNA (dos próprios ratos ou de seqüências do vetor) apresentaram resultados negativos (Figura 17). Amostras de fígado dos animais tratados com os genes terapêuticos apresentaram resultados negativos, demonstrando a ausência de disseminação dos vetores não virais. Amostras de músculo isquêmico dos animais controle não apresentaram amplificação, demonstrando a ausência de amplificação cruzada de fatores de crescimento endógenos pelos “primers” dos genes humanos.

Tabela 4- Padrão temporal da expressão dos genes terapêuticos

	Dia 3	Dia 28
VEGF-A	+	+
FGF-2	+	-
PDGF-BB	+	-

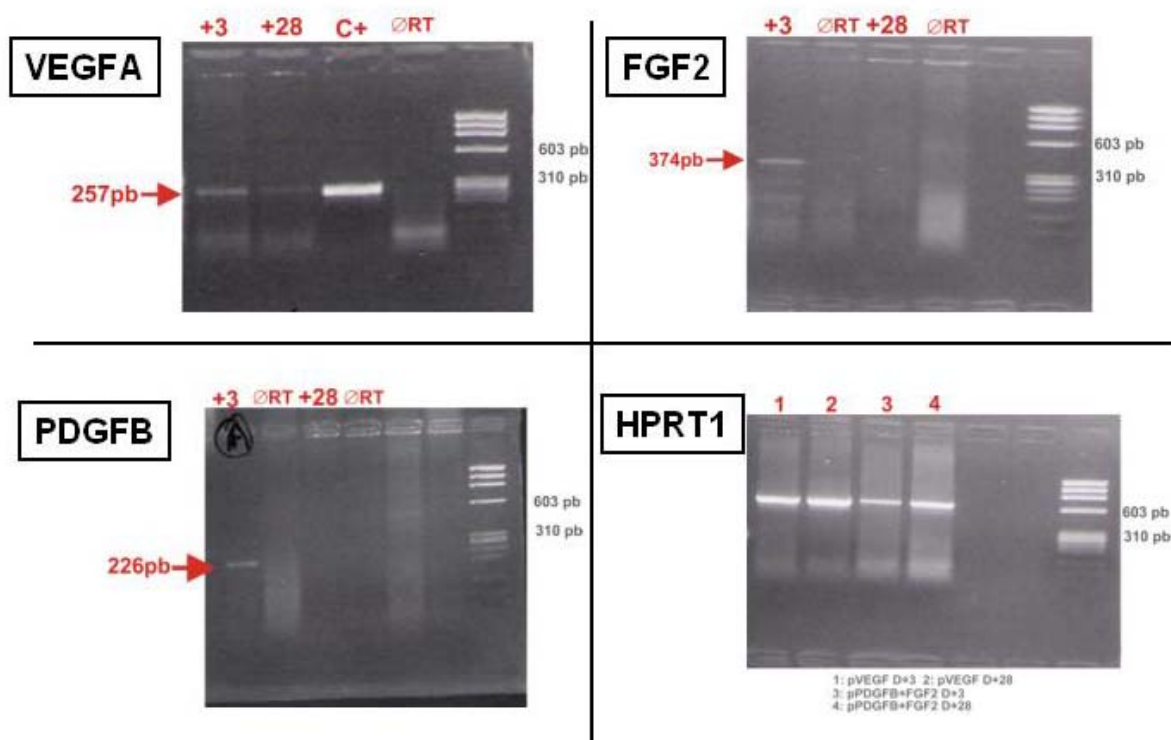


Figura 17- Avaliação do padrão temporal da expressão dos genes terapêuticos

Figura 17- PCR com transcrição reversa de amostras de músculo esquelético dos experimentos de transferência gênica. Em animais tratados com pVEGF a expressão do gene VEGFA foi detectada nos dias +3 e +28. Em animais tratados com a combinação pFGF2+pPDGFB, a expressão dos genes FGF2 e PDGFB foi detectada apenas no dia +3. Amostras realizadas em paralelo sem a adição de transcriptase reversa (ØRT) não mostraram amplificação.

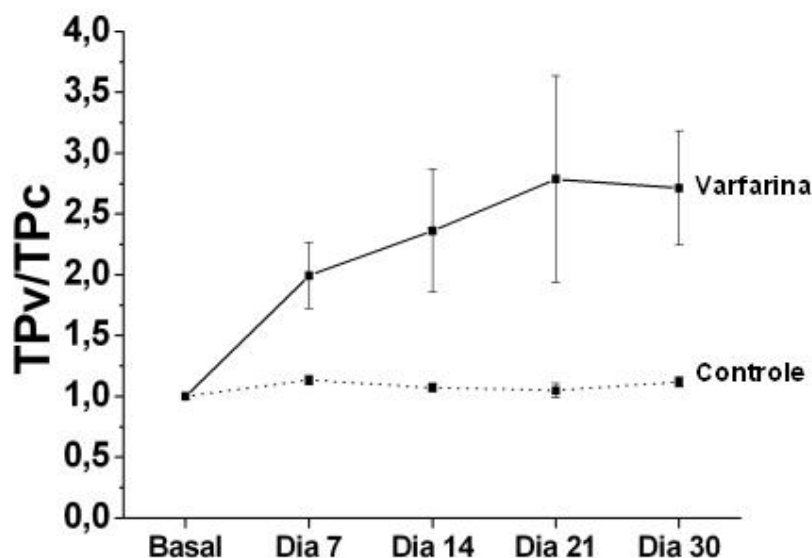
Em conjunto, esses dados sugerem que a transferência gênica combinada do FGF-2/PDGF-B apresenta duração de expressão gênica curta, mas efetiva, com o benefício adicional de induzir a formação de neovasos mais íntegros do que aqueles formados em resposta ao VEGF-A.

4.6 - Inibição aguda da geração de trombina compromete a indução de angiogênese pós-natal

Baseados em estudos em animais “knockout” demonstrando a importância da geração de trombina durante a angiogênese pré-natal, nossa hipótese foi que a redução da geração de trombina poderia influenciar negativamente a resposta angiogênica. A maioria dos estudos nessa área são estudos *in vitro*, em que o efeito de drogas e os modelos de angiogênese não são necessariamente extrapoláveis para condições *in vivo*. Dessa forma, nós avaliamos a resposta angiogênica à isquemia arterial periférica (modelo A) em ratos sob terapia anticoagulante.

4.6.1 - Efeito *in vivo* do uso crônico de anticoagulantes sobre a angiogênese no modelo de isquemia da pata posterior em ratos

O uso crônico de varfarina, r-hirudina ou enoxaparina resultou em anticoagulação sustentada e clinicamente relevante em ratos Lewis. Em animais tratados com varfarina sódica, os valores do TP no dia + 7 pós cirurgia variou de 1,39 a 2,87 vezes o tempo basal (TP basal em 6 animais não tratados foi $14,7 \pm 0,4$ segundos). Com um incremento de 25 a 30% na dose de varfarina por kg de peso, efeito anticoagulante foi obtido de maneira uniforme, com doses de manutenção entre 0,25 a 0,37 mg/kg/dia. No dia 30 após a cirurgia, os valores de TP eram pelo menos 2 vezes maior que os valores dos animais do grupo controle, e os fatores pró-coagulantes dependentes de vitamina K (FII:C, FVII:C, FIX:C e FX:C) estavam significativamente diminuídos (entre 2,3 a 6 vezes) em todos os animais tratados em comparação com os controles (Figura 18). Entre os animais tratados com r-hirudina, o TTPa obtido 4 horas após a última dose foi 1,5 a 2,7 vezes maior que os valores basais (TTPa basal em 6 animais não tratados foi $13,2 \pm 0,7$ segundos). Os valores de TTPa foram: dia +7 ($26,2 \pm 2,8$ segundos) e dia +14 ($26,6 \pm 1,4$ segundos). Entre os animais tratados com enoxaparina, concentração média de heparina de $0,50 \pm 0,04$ U/ml foi obtida no dia +30 após a cirurgia. Um animal do grupo tratado com enoxaparina apresentou um hematoma subcutâneo no local da injeção, e um animal tratado com r-hirudina evoluiu para óbito por sangramento difuso na 3ª semana de experimento.



	Controle (n=6)	Varfarina (n=6)	P
F II:C ⁺	100,00 ± 28,94	22,67 ± 16,65	<0,001
F VII:C	100,00 ± 52,84	29,83 ± 21,25	<0,001
F IX:C ⁺	100,00 ± 27,06	14,29 ± 10,28	<0,001
F X:C	100,00 ± 41,11	41,01 ± 27,36	0,3

Figura 18- Efeitos do uso crônico da varfarina em ratos Lewis sobre parâmetros da coagulação

Figura 18- (a) Relação entre o tempo de protrombina de animais controle (linha tracejada, n=6) e animais tratados com varfarina (linha escura; n=6) (TPv/TPc), antes e após (dias +7, +14, +21 e +30) a isquemia da pata posterior. (b) No dia +30, todos os fatores pró-coagulantes dependentes de vitamina K estavam significativamente diminuídos em comparação com os animais controle, tratados com solução salina (P <0,05; Teste de Mann-Whitney). Resultados expressos como porcentagem dos valores médios obtidos em ratos controle ± erro padrão da média.

4.8.2 - Anticoagulação crônica não influencia parâmetros funcionais em repouso da revascularização fisiológica

4.6.2 - Anticoagulação crônica não influencia parâmetros funcionais em repouso da revascularização fisiológica

Após a remoção cirúrgica da artéria femoral direita (modelo A), sinais de isquemia foram visíveis em todos os animais já no dia +7 pós cirurgia. Estes sinais desapareceram gradativamente a partir do dia +14, e estavam completamente ausentes no dia +28 na totalidade dos animais controle e anticoagulados, sem nenhuma diferença no padrão de resolução destes sinais entre os grupos. Em concordância com estes dados, nenhuma diferença foi observada na perfusão relativa entre animais tratados com varfarina ($I/N = 0,76 \pm 0,02$; $n=6$), r-hirudina ($I/N = 0,72 \pm 0,04$; $n=4$) ou enoxaparina ($I/N = 0,81 \pm 0,04$; $n=5$) quando comparada com o grupo controle ($I/N = 0,72 \pm 0,03$; $n=6$ - $P=0,28$; teste de Kruskal-Wallis) (Figura 19).

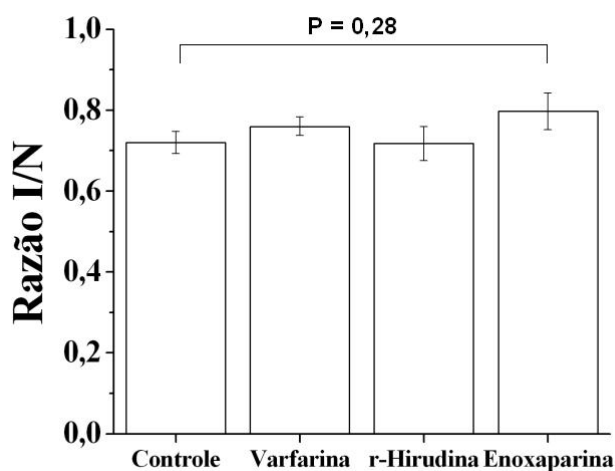


Figura 19- Efeitos do uso crônico de anticoagulantes sobre a perfusão relativa

Figura 19- Perfusão relativa expressa pela razão I/N no dia +28, mostrando valores semelhantes em todos os grupos experimentais. ($P=0,28$; teste de Kruskal-Wallis; $n=5$ para varfarina e controle e $n=4$ para r-hirudina e enoxaparina). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

4.6.3 - A inibição da geração de trombina iniciada precocemente inibe a resposta angiogênica

A densidade capilar determinada para animais tratados com r-hirudina ($181,79 \pm 7,83$ capilares/mm²; n=4) e enoxaparina ($164,83 \pm 25,78$ capilares/mm²; n=4) foi significativamente menor que no grupo controle ($273,7 \pm 25,01$ capilares/mm²; n=6) (P=0,001 e 0,04 respectivamente; teste de Mann-Whitney). Em concordância com estas observações, o número de capilar por miócito em animais tratados com r-hirudina ($0,56 \pm 0,05$) e enoxaparina ($0,71 \pm 0,06$) também foi significativamente menor que em animais do grupo controle ($0,99 \pm 0,06$). Em contraste, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi demonstrada entre animais tratados com varfarina e controle na comparação dos dois parâmetros (Figura 20).

Em conjunto, esses dados demonstram que a geração de trombina durante a fase de indução da resposta angiogênica é crítica. Esses dados não são facilmente extrapolados de experimentos utilizando cultura de células e demonstram, pela primeira vez, a correlação entre coagulação e resposta angiogênica pós-natal.

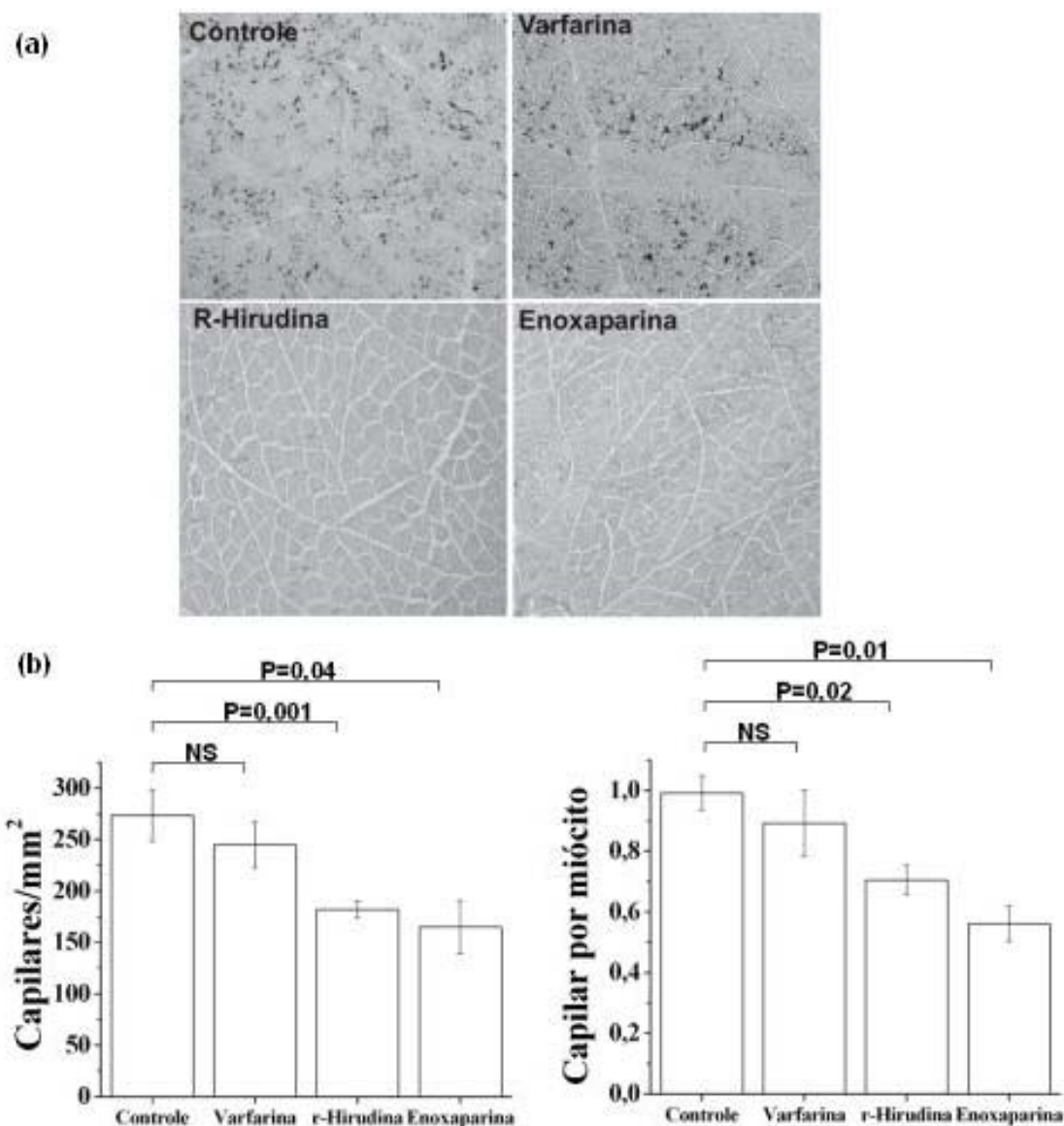


Figura 20- Avaliação da densidade capilar nos experimentos de anticoagulação crônica

Figura 20- (a) Microfotografias representativas de cortes do músculo semimembranoso (7 μ m) corado para fosfatase alcalina endógena de ratos tratados com solução salina (controle), varfarina, r-hirudina e enoxaparina (Aumento de 100x), demonstrando uma evidente diminuição na densidade capilar nestes dois últimos grupos, demonstrada no histograma (b). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média; n=6 para grupos controle e varfarina e n=4 para grupos r-hirudina e enoxaparina.



5- DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novas alternativas de prevenção e tratamento para pacientes com DAO é um dos maiores desafios da ciência médica na atualidade. Neste contexto, a “angiogênese terapêutica” surgiu a partir do início dos anos 90 como uma alternativa promissora para pacientes com DAO avançada. Desde os estudos iniciais, a TG foi utilizada como plataforma preferencial para a angiogênese terapêutica.

Várias razões fazem com que pacientes com DAOCP, e em especial aqueles com ICMI, sejam excelentes candidatos à angiogênese terapêutica baseada na TG. A limitação dos tratamentos disponíveis, a existência de modelos animais que recapitulam os processos de revascularização, a possibilidade de obtenção de sucesso terapêutico com a expressão limitada e transitória de genes de fatores de crescimento vascular e a relação risco-benefício favorável justificam o investimento na TG como forma de tratamento da ICMI. Estudos de fase 1 já comprovaram a segurança e o potencial de eficácia desta estratégia. Atualmente, a área atravessa uma fase em que modificações técnicas e conceituais nos protocolos terapêuticos estão sendo novamente testados em modelos animais, a fim de possibilitar o desenvolvimento de protocolos mais eficazes em humanos.

Vários fatores podem ser otimizados com o intuito de maximizar a eficácia da TG na angiogênese terapêutica: (1) a escolha de parâmetros de eficácia clinicamente relevantes, seja em modelos animais ou em estudos clínicos, (2) o critério na extrapolação de resultados obtidos em roedores para humanos, (3) a utilização de modelos animais que recapitem com fidedignidade cada vez maior a ICMI em humanos, (4) o uso de combinações de fatores de crescimento vascular, e (5) o conhecimento da influência de outras variáveis como drogas utilizadas pelos pacientes no resultado final do tratamento.

Assim, vencida a etapa de demonstração conceitual do potencial de indução de novos vasos em tecidos isquêmicos através do uso de fatores de crescimento vascular exógenos, o desafio atual é traduzir esta observação em um tratamento eficaz e seguro para os pacientes.

Os objetivos deste trabalho procuram contribuir neste processo, desenvolvendo estudos baseado na terapia gênica utilizando combinações de fatores pró-angiogênicos em modelos animais.

No modelo de isquemia da pata posterior de ratos, a avaliação da eficácia da neovascularização terapêutica pode ser feita por métodos anatômicos (angiografia e histologia) e métodos funcionais (ensaios de perfusão com microesferas, avaliação da tensão de O₂ muscular ou “doppler”). Embora os métodos anatômicos dêem informações quantitativas simples e diretas sobre a formação de novos vasos, estes métodos nada dizem a respeito da contribuição destes neovasos para perfusão tecidual, especialmente no que diz respeito a capilares. Por este motivo, a utilização de métodos funcionais é de fundamental importância nestes estudos. De fato, a utilização de métodos inadequados de avaliação pode levar a conclusões inadequadas em estudos pré-clínicos.

Ensaios de perfusão utilizando microesferas são considerados o “padrão-ouro” para a determinação da perfusão relativa nestes estudos. No entanto, por se tratarem de métodos invasivos e laboriosos, eles são frequentemente substituídos por imagens construídas por “doppler” tecidual (LDPI), que é atualmente o método funcional mais utilizado neste modelo. Embora não invasivo, o LDPI tem como desvantagem o elevado custo do equipamento e o fato de avaliar a perfusão exclusivamente nos vasos da pele.

Em nosso estudo desenvolvemos um protocolo de avaliação da perfusão relativa da pata posterior isquêmica através de cintilografia com 99mTc-sestamibi. O 99mTc-sestamibi é um cátion lipofílico usado primordialmente na avaliação da perfusão miocárdica (Kiat et al., 1989), também já utilizado na avaliação da perfusão do músculo esquelético em pacientes com DAOCP (Bajnok et al., 1994). A captação celular do 99mTc-sestamibi é determinada não apenas pelo fluxo sanguíneo regional, mas também pela viabilidade e metabolismo teciduais (Beanlands et al., 1990), fazendo dele um agente ideal para avaliação não apenas da perfusão mas também da viabilidade muscular, uma variável relevante em estudos de neovascularização terapêutica. Com este método, pudemos demonstrar a presença de isquemia grave imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, bem como acompanhar a progressiva recuperação fisiológica da perfusão relativa que ocorre ao longo das quatro semanas subsequentes. Conforme descrito no modelo, esta recuperação não chega a atingir os valores pré-operatórios. Além disso, as diferenças entre a perfusão relativa pré-operatória e a observada nos dias 7, 14 e 28 foram estatisticamente significativas, permitindo a utilização do método para avaliação do efeito

de fatores interfiram na neovascularização fisiológica da pata. Embora este método já houvesse sido utilizado na avaliação pós-operatória imediata da isquemia aguda da pata posterior em ratos (Mack et al., 1998), sua capacidade de discriminar diferenças menores de perfusão relativa observadas ao longo do seguimento crônico destes animais não havia sido demonstrada. Quando a cintilografia com ^{99m}Tc -sestamibi foi comparada com o “padrão-ouro” para avaliação de perfusão, valores de perfusão relativa de toda a pata posterior foram semelhantes à perfusão relativa de músculos proximais da coxa (semimembranoso e adutores).

Em resumo, a cintilografia com ^{99m}Tc -sestamibi é uma estratégia alternativa para avaliação funcional da eficácia em estudos de neovascularização terapêutica com o modelo de isquemia da pata posterior em ratos. Além disso, o método apresenta a vantagem adicional de fornecer informações relevantes sobre a viabilidade muscular. A possibilidade de sua utilização em estudos clínicos de neovascularização terapêutica a torna um método ainda mais atraente para a estudos que busquem traduzir de forma mais precisa achados pré-clínicos em tratamentos efetivos.

Além da técnica de cintilografia descrita acima, neste trabalho utilizamos um índice de isquemia clínica previamente padronizado em modelos de isquemia da pata posterior em ratos. A utilização deste parâmetro de eficácia foi possível pela utilização de um modelo caracterizado por isquemia tecidual mais grave, em que sinais clínicos de isquemia são facilmente avaliáveis. Assim, a utilização deste parâmetro fortalece as conclusões de trabalhos que avaliam a eficácia de estratégias de neovascularização terapêutica. O desenvolvimento desse modelo animal foi satisfatório e fundamental para testar nossas hipóteses no desenvolvimento da angiogênese terapêutica para DAOCP.

Vários fatores pró-angiogênicos participam durante o processo de fisiológico normal de formação de vasos. No entanto, esse conceito não foi considerado nas propostas iniciais de angiogênese terapêutica que visavam o uso de um único agente pró-angiogênico. Esse raciocínio é lógico do ponto de vista terapêutico, na medida em que desenvolver uma nova terapia baseada em uma única droga é mais atraente do que a combinação de diferentes agentes. Além disso, os resultados obtidos em uma série de estudos em animais (camundongos, ratos e coelhos) confirmaram a eficácia *in vivo* usando um único agente

pró-angiogênico. Somente depois dos estudos fase 1 em humanos é que as complicações relacionadas à formação de neovasos não totalmente competentes (edema, proteinúria) ficaram evidentes. Atualmente, uma das alternativas que vem sendo testada para a obtenção de melhores resultados em protocolos de neovascularização terapêutica é a utilização de associações de fatores de crescimento. A possibilidade de associar fatores pró-angiogênicos como o VEGF-A e o FGF-2 com fatores que induzem a maturação de novos vasos como o PDGF-BB e a angiopoietina-1 é extremamente atraente, por seus efeitos complementares ou em alguns casos, até sinérgicos. A sinergia entre dois fatores pró-angiogênicos é desejável na medida em que permite uma redução da dose de cada componente, aumentando a segurança do tratamento. Desta forma, a avaliação destas estratégias em modelos animais é parte fundamental do desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos de angiogênese terapêutica.

Recentes evidências demonstraram que a infusão da combinação de fatores FGF-2 e PDGF-BB sob a forma de proteínas recombinantes resulta em efeito pró-angiogênico sinérgico, através do qual uma rede de neovasos altamente desenvolvida é formada e sustentada por um tempo superior ao tempo de exposição aos fatores, em vários modelos in vivo de angiogênese (Cao et al., 2003). Cao et al (2003) demonstraram que a associação entre o FGF-2 e PDGF-BB apresenta resultados superiores ao uso isolado de FGF-2, PDGF-BB ou VEGF-A, ou a qualquer outra combinação entre estes fatores. É importante notar que nesse estudo, as proteínas pró-angiogênicas foram administrados através da implantação de polímeros de liberação lenta e por injeções intramusculares repetidas por 12 dias nos tecidos isquêmicos, e que a avaliação da neovascularização foi feita após o dia +28. Dessa forma, a combinação de fatores pró-angiogênicos, associado a vias de administração que garantiram a exposição sustentada aos agentes terapêuticos é que determinaram o efeito dessa estratégia terapêutica.

Assim, nosso objetivo principal foi verificar se o uso da terapia gênica, como alternativa às inúmeras injeções intra-musculares, poderia resultar em benefício semelhante ao obtido com o uso de proteínas recombinantes. A seleção do FGF-2 e do PDGF-BB deveu-se ao papel complementar que estes fatores exercem no desenvolvimento vascular, atuando como agentes indutores da formação de brotos capilares (FGF-2) ou como

estabilizadores da parede vascular pelo recrutamento de pericitos e células musculares lisas (PDGF-BB). A transferência gênica do VEGF-A foi selecionada como controle positivo de eficácia, por se tratar da estratégia mais amplamente testada no modelo de isquemia da pata posterior, tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos. Além disso, a descrição de edema de extremidades em pacientes com ICMI tratados com VEGF-A em estudos clínicos de angiogênese terapêutica deixa claro que o efeito de aumento de permeabilidade vascular do VEGF-A é uma limitação significativa para seu uso clínico. Desta forma, a possibilidade de obter vasos mais íntegros viria de encontro à necessidade de maximização da eficácia da angiogênese terapêutica.

O principal achado de nossos experimentos foi que a terapia gênica usando vetores não virais com uma combinação dos genes do FGF-2 e do PDGF-BB foi capaz de induzir um aumento significativo na resposta angiogênica (aumento da densidade capilar) e arteriogênica (aumento do número de arteríolas), comparável ao obtido pela transferência gênica do VEGF-A. Além disso, este aumento associou-se a melhora de parâmetros funcionais da perfusão dos tecidos isquêmicos semelhantes nos dois grupos, quando comparados ao placebo (vetor vazio). A utilização da cintilografia com ^{99m}Tc-sestamibi nesta avaliação aumenta a relevância de nossos achados.

Em termos de segurança, a combinação FGF-2/PDGF-BB se mostrou capaz de induzir vasos de maior integridade que o VEGF-A isolado. Esta observação é de grande relevância para o desenvolvimento de protocolos clínicos para tratamento da ICMI. Além disso, os resultados obtidos com a combinação de genes terapêuticos foi obtido utilizando doses individuais 50% menores de cada gene terapêutico, o que levou a um padrão de expressão gênica mais curta do FGF-2 e PDGF-BB comparados ao VEGF-A. O uso de menores doses de fatores pró-angiogênicos resulta em menor expressão local de cada fator e conseqüentemente menos proteína tem acesso a circulação e a outros sítios no corpo. Isner et al documentaram detecção transitória do VEGF em amostras de sangue circulante (Isner et al., 1996). Considerando que a exposição a fatores de crescimento vascular como o VEGF-A tem o potencial de acelerar lesões malignas incipientes, aterosclerose e vasculopatia proliferativa em pacientes diabéticos, a possibilidade de obtenção do mesmo efeito terapêutico às custas de menor expressão dos genes terapêuticos torna esta estratégia ainda mais atraente no que diz respeito à segurança.

Tanto o FGF-2 quanto o PDGF-BB são fatores de crescimento cuja atividade mitogênica sobre CE já foi demonstrada (Conway et al., 2001). No entanto, os relatos são contraditórios no que diz respeito ao efeito da combinação dos dois fatores sobre a angiogênese *in vitro* (De Marchis et al., 2002; Russo et al., 2002). No contexto da neovascularização terapêutica, Cao e colaboradores demonstraram um robusto efeito sinérgico entre os dois fatores sobre a angiogênese e arteriogênese (Cao et al., 2003). Usando uma estratégia semelhante à testada em nosso estudo, baseada na terapia gênica com vetores não virais, Hao e colaboradores também demonstraram o efeito pró-angiogênico da combinação entre estes dois fatores, embora não tenham reproduzido o efeito sinérgico descrito no estudo com proteínas (Hao et al., 2004). Neste aspecto nossos resultados se assemelham aos descritos por Hao et al. A explicação para estas diferenças não está completamente elucidada. O papel e padrão de expressão dos diferentes receptores do PDGF (PDGF-R) podem explica-las parcialmente. As ações do PDGF são mediadas pelo PDGF-R α e PDGF-R β . PDGF-R β é conhecido por ativar vias de sinalização pró-angiogênicas (Battegay et al., 1994), ao passo que o PDGF-R α medeia ao menos em parte um efeito inibitório recíproco entre FGF-2 e PDGF-BB *in vitro* (De Marchis et al., 2002; Russo et al., 2002). Recentemente, Faraone e colaboradores demonstraram que sob certas condições *in vitro*, a formação de heterodímeros entre receptores do FGF-2 e PDGF-R α é responsável pela inibição recíproca entre os fatores (Faraone et al., 2005). Estes autores levantaram a hipótese que o padrão de expressão destes fatores e de seus receptores controla a cinética de formação de complexos receptores/ligantes, levando a sinais ativadores (homo-complexos) ou inibitórios (hetero-complexos) sobre a angiogênese, dependendo da disponibilidade de cada molécula em situações fisiológicas ou patológicas distintas. Assim, uma possível explicação para as diferenças de intensidade do efeito entre os dois fatores observadas entre o estudo com proteínas e os estudos com terapia gênica é a quantidade relativa de cada fator a que os tecidos isquêmicos foram expostos. Em concordância com esta hipótese, no estudo de Hao e colaboradores e no presente estudo, utilizamos uma relação de 1:1 entre os vetores, que pressupõe uma relação de massa de 1:1 entre os fatores nos tecidos. Em contraste, no estudo com proteínas recombinantes uma relação de 1:2 entre FGF-2 e PDGF-BB foi usada, relação esta que segundo os autores teria sido fundamental para a obtenção do efeito sinérgico entre os fatores.

Por outro lado, não é possível descartar que a diferença entre esse estudos seja apenas a resultante de cinética de exposição do tecido isquêmico aos fatores pró-angiogênicos: exposição contínua a baixas concentrações versus exposição a picos transitórios dos fatores pró-angiogênicos após o uso da TG ou de injeções intramusculares seriadas respectivamente. Experimentos utilizando proporções distintas de cada gene terapêutico, ou vetores que garantam expressão mais robusta, como os vírus adeno-associados são necessários para a definição da dose relativa ótima a ser utilizada em humanos.

Em nosso trabalho, o aumento da proliferação capilar, representando a resposta angiogênica, foi mais evidente nos músculos da panturrilha, enquanto o aumento da densidade arteriolar e a formação de vasos com menor permeabilidade capilar, duas características da arteriogênese, foram mais evidentes nos músculos mais proximais do membro. Outros autores já observaram diferenças semelhantes na resposta angiogênica e arteriogênica entre músculos proximais e distais da pata posterior neste modelo experimental (Scholz et al., 2002). Uma possível explicação pode estar relacionada à maior tolerância à isquemia dos músculos proximais do que músculos mais distais (Dregelid et al., 1983). Esta diferença - que pode decorrer tanto da composição de fibras (tipo I/tipo II) de cada músculo, como de características da circulação arterial para estes músculos - tem como resultado graus distintos de necrose, que poderiam inviabilizar a capacidade de produção e/ou resposta a fatores de crescimento vascular.

Nossos dados demonstram que a expressão transitória de FGF-2/PDGF-BB através de vetores não virais é uma alternativa eficaz ao uso de proteínas recombinantes para a neovascularização terapêutica. A comparação direta da expressão local dos fatores de crescimento demonstra que apenas o RNAm do VEGF-A pode ser detectado no dia +28 do experimento, e que a expressão do FGF-2/PDGF-BB se perde em algum momento entre os dias +3 e +28. Nossa hipótese é que doses individuais menores destes dois genes terapêuticos estão associadas a expressão de curta duração, que no entanto não deixa de ser eficaz. Este caráter transitório da expressão reforça a segurança desta estratégia terapêutica. Esta hipótese está em acordo com as observações de Cao e colaboradores que demonstraram que a exposição a estes fatores por tempo limitado foi efetiva na obtenção de neovascularização (Cao et al., 2003).

Nosso interesse neste sistema fica então reforçado pelo potencial de obtenção de efeitos terapêuticos às custas de expressão limitada e transitória, com extravasamento mínimo ou inexistente do produto transgênico para outros tecidos. Além disso, as vantagens de produção em larga escala do plasmídeo DNA se tornam ainda mais significativas quando consideramos fatores de custo e operacionalização do uso de proteínas recombinantes, ainda que por poucos dias, no contexto de uma doença de prevalência tão significativa como a DAOCP.

Cao e colaboradores também demonstraram que a infusão de FGF-2/PDGF-BB foi eficaz em um modelo de isquemia da pata posterior em coelhos. Mais experimentos são necessários, em animais de maior porte, para que possamos estabelecer se esta estratégia de terapia gênica é específica ou não para animais de pequeno porte. Outros sistemas de expressão com vetores não virais, como o eficiente plasmídeo-DNA “minicircle” podem ser uma alternativa caso níveis mais elevados de expressão sejam necessários em animais de maior porte (Chen et al., 2003).

O modelo de isquemia da pata posterior vem sendo amplamente utilizado em estudos pré-clínicos para avaliação de estratégias terapêuticas (“angiogênese terapêutica”) aplicáveis a pacientes com DAOCP. Neste modelo, a queda abrupta do fluxo sanguíneo decorrente da ligadura da artéria femoral ativa uma série de mecanismos que, ao longo de 3 a 4 semanas, induzem uma recuperação parcial do fluxo sanguíneo. Esta recuperação depende da angiogênese, arteriogênese e vasculogênese (Scholz et al., 2002; Shintani et al., 2001), e recapitula os mecanismos envolvidos na neovascularização de tecidos isquêmicos. O tempo de avaliação de 4 semanas é utilizado com o objetivo de avaliar a adaptação crônica do tecido à isquemia. No entanto, três limitações merecem ser destacadas quanto à utilização deste modelo nestes estudos. Em primeiro lugar, o modelo não mimetiza de forma adequada a progressão lenta da aterosclerose em humanos. Em segundo lugar, ratos ou coelhos normalmente utilizados neste modelo têm endotélio normal, ao contrário de pacientes com DAOCP que freqüentemente apresentam co-morbidades associadas a disfunção endotelial tais como diabetes, hipertensão, senilidade, dislipidemia. E finalmente, a detecção de edema de membros inferiores como parâmetro clínico de integridade dos neovasos ainda não está adequadamente explorada nesse e em outros modelos animais.

Estas diferenças devem ser consideradas quando avaliamos resultados obtidos com este modelo, e podem justificar em parte a dificuldade de reprodução dos resultados obtidos em animais nos estudos clínicos de angiogênese terapêutica.

Por estes motivos, a perspectiva de utilização do modelo em estudos futuros prevê a associação de estratégias que minimizem a influência destas limitações. Entre estas estratégias podemos citar a utilização de constritores ameróides adaptáveis à artéria femoral de ratos com o objetivo de tornar mais lenta a progressão da isquemia (Tang et al., 2005) e a utilização de camundongos transgênicos com alterações específicas na função endotelial (Galasso et al., 2006).

Na última parte desse estudo, nosso objetivo foi avaliar o papel da geração de trombina na angiogênese pós-natal. Aqui nós testamos como a inibição parcial da coagulação, em níveis comumente alcançados em pacientes anticoagulados, afetaria a neovascularização característica do modelo de isquemia da pata posterior em ratos adultos.

A superfície endotelial, como ponto de contato entre a parede do vaso e o compartimento fluido intravascular, é o sítio onde ocorrem todas as reações da hemostasia quando o endotélio é lesado. A partir desta perspectiva, é possível imaginar que as reações da hemostasia participem não somente do processo de coagulação do sangue, mas também em outras etapas do reparo da lesão vascular, entre as quais estão o estímulo à proliferação de CE e formação de novos vasos.

Os mecanismos através dos quais a trombina participa da angiogênese estão bem documentados em camundongos deficientes de fatores pró-coagulantes, PAR-1 e fator tissular (Moser e Patterson, 2003). Experimentos *in vitro* também demonstraram o papel fundamental da trombina em várias etapas da angiogênese, necessárias para a formação de uma rede vascular funcional. Estas etapas incluem o aumento da permeabilidade vascular (Garcia JG et al., 1995; Garcia JG e Schaphorst, 1995), a degradação da matriz extracelular por MMP (Galis et al., 1997; Zucker et al., 1995; Zucker et al., 1998), aumento da migração e proliferação de CE (Senger et al., 1996; Wang HS et al., 1997), aumento da expressão de fatores como o VEGF e a Ang2 (Huang et al., 2001; 2002), e do receptor do VEGF (Tsopanoglou e Maragoudakis, 1999). A trombina também participa da angiogênese

através de mecanismos relacionados a sua ação pró-coagulante envolvendo a ativação plaquetária e a clivagem do fibrinogênio. Plaquetas ativadas liberam grande quantidade de fatores de crescimento vascular como o VEGF e o PDGF, ao passo que a deposição de fibrina funciona como um suporte transitório para a migração de CE e formação de tubos vasculares (Contrino et al., 1996; Nagy et al., 1989).

Aqui nós demonstramos pela primeira vez que a inibição direta da trombina e/ou do fator Xa *in vivo* resultou em uma diminuição da proliferação capilar em resposta à isquemia, quando a anticoagulação foi iniciada nas primeiras horas após o estímulo angiogênico. Curiosamente, nenhum efeito adverso sobre a resposta angiogênica pode ser demonstrado quando a anticoagulação foi iniciada após 72 horas do estímulo. Este efeito tempo-dependente pode ser explicado pelo fato de que os eventos moleculares e celulares associados com a angiogênese se iniciam imediatamente após a indução da isquemia (Lee et al., 2004). Desta forma, nossos dados sugerem a existência de uma janela de tempo estreita na qual os níveis de trombina podem modular a resposta angiogênica pós-natal de forma análoga ao que ocorre na angiogênese no embrião.

A enoxaparina e a hirudina atuam inibindo o Fxa/trombina e a trombina respectivamente, e ambas são drogas de ação rápida. Isto sugere que os efeitos sobre a angiogênese descritos não são específicos de cada composto, mas sim o resultado da ação final destas drogas. De fato, a ação anti-angiogênica da hirudina (Caunt et al., 2003) e das HBPM (Collen et al., 2000) (Mousa e Mohamed, 2004) já foi demonstrada previamente *in vitro*.

Nesta fase, os experimentos foram desenhados para mimetizar, em certo grau, situações clínicas em que a neovascularização terapêutica seria indicada para pacientes em uso de anticoagulantes. Devido ao fato de pacientes com DAO frequentemente fazerem uso de anticoagulantes, nós optamos por testar drogas comumente utilizadas na clínica, com mecanismos de ação e estrutura molecular distintos. Ao selecionarmos drogas e doses comparáveis às usadas em humanos, nós demonstramos que o efeito anti-angiogênico de drogas anticoagulantes devem ser uma preocupação no processo de tradução de resultados pré-clínicos desta nova estratégia, i.e. neovascularização terapêutica, para humanos.

Nos experimentos com a varfarina, quando administrada 72 horas após a indução da isquemia, nenhum efeito inibitório sobre a angiogênese foi documentado, a despeito da obtenção de anticoagulação plena e sustentada. Wang e colaboradores demonstraram recentemente que a diminuição *in vitro* da vitamina K epóxi redutase por oligonucleotídeos anti-sense inibiu a proliferação de CE por um mecanismo independente da diminuição dos fatores da coagulação vitamina K dependentes (Wang Y et al., 2005). Em conjunto estes dados sugerem que o efeito inibitório sobre a resposta angiogênica neste modelo de isquemia da pata posterior ocorre dentro de uma janela de tempo estreita (<72h), ao mesmo tempo em que levantam a possibilidade de que, em pacientes sob anticoagulação com varfarina, a resposta angiogênica possa ser comprometida mesmo na ausência de anticoagulação plena.

Nestes experimentos, a inibição da resposta angiogênica, representada pela diminuição da proliferação capilar não foi associada a alterações em parâmetros funcionais da neovascularização (perfusão relativa). Nesta fase dos experimentos utilizamos um modelo de isquemia da pata posterior em que manifestações clínicas de isquemia (úlceras de pressão, necrose) estão ausentes em repouso. Como os testes funcionais são realizados em repouso é possível que pequenas diferenças na perfusão relativa não sejam detectáveis pelo método utilizado. De fato, já foi demonstrado que exercícios isométricos, em geral induzidos pela estimulação elétrica dos músculos isquêmicos, são capazes de revelar o déficit de perfusão no modelo de isquemia da pata posterior (Brevetti et al., 2001; Challiss et al., 1986; Walder et al., 1996). Além disso, caso estes animais apresentassem disfunção endotelial normalmente presente em pacientes com DAO, o impacto dos efeitos da hirudina e enoxaparina sobre parâmetros funcionais poderia ser mais evidente. Experimentos semelhantes em animais com disfunção endotelial tais como diabéticos, senis ou com propensão ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas seriam necessários para exclusão desta possibilidade.

Em resumo, nossos dados demonstram que o uso de drogas anticoagulantes como a hirudina e a enoxaparina no momento do estímulo à neovascularização de tecidos isquêmicos impede uma resposta angiogênica normal. Esta observação é relevante na medida em que o uso destas drogas pode comprometer o resultado de estudos clínicos de

neovascularização terapêutica com proteínas recombinantes ou terapia gênica, especialmente estudos iniciais que frequentemente usam doses baixas ou mesmo sub-terapêuticas dos agentes testados. Por outro lado, é possível que a ativação de receptores celulares da trombina presente em células endoteliais (PAR-1 e PAR-4) durante a indução da angiogênese terapêutica possa potencializar a resposta neovascular. O uso de peptídeos agonistas específicos dos PARs (1 ou 4) em conjunção com os fatores pró-angiogênicos (proteína ou por TG) pode oferecer um efeito sinérgico no tratamento da DAOCP.

Os dados apresentados neste trabalho abrem perspectivas para novos estudos de angiogênese terapêutica: a avaliação da angiogênese terapêutica combinada com o FGF-2/PDGF-BB através da TG em animais maiores (coelhos), bem como a otimização das doses relativas de cada fator pró-angiogênico e dos níveis de expressão do transgene adequados para uma relação eficácia/segurança satisfatória são questões importantes a serem investigadas. Por outro lado, nossos dados também abrem perspectivas para o estudo do papel da trombina na angiogênese pós-natal. Estudos com o modelo de isquemia da pata posterior em camundongos “knockout” com deficiência de PAR-1 podem ajudar a elucidar o papel das ações celulares da trombina na angiogênese pós-natal. Analogamente, é possível que a ativação de receptores celulares da trombina presente em CE (PAR-1 e PAR-4) durante a indução da angiogênese terapêutica possa potencializar a resposta neovascular, fazendo dos receptores celulares de trombina nas CE um alvo terapêutico potencial para a angiogênese terapêutica. O uso de peptídeo agonistas específicos dos PARs (1 ou 4) em conjunção com os fatores pró-angiogênicos (proteína ou por TG) podem oferecer um efeito sinérgico no tratamento da DAOCP.



6- CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos inicialmente propostos neste estudo, de contribuir para o desenvolvimento de uma nova estratégia de angiogênese terapêutica baseada em TG, concluímos que:

1. A expressão transitória de FGF-2 associada à de PDGF-BB pela TG com vetores não virais é uma estratégia eficaz para angiogênese e arteriogênese terapêutica no modelo de isquemia da pata posterior em ratos. Neste modelo a TG combinada alcança resultados anatômicos e funcionais semelhantes à transferência gênica isolada do VEGF-A. O benefício desta combinação foi ainda avaliado através de nova metodologia baseada na utilização da cintilografia com ^{99m}Tc-sestamibi. Dessa forma foi possível a avaliação não invasiva do impacto dos vasos neoformados sobre a perfusão tecidual. Além disso, a transferência gênica combinada do FGF-2 e PDGF-BB apresentou o benefício adicional de induzir a formação de neovasos mais íntegros, que o VEGF-A isolado, e de obtenção do efeito terapêutico às custas de doses individuais reduzidas de cada gene. Estas duas características são atraentes do ponto de vista de segurança da estratégia terapêutica proposta.
2. O uso de drogas anticoagulantes de ação rápida como a enoxaparina e a hirudina no momento da indução da isquemia no modelo de isquemia de pata posterior em ratos inibe a resposta angiogênica, expressa pela proliferação de capilares no músculo isquêmico. Esta observação sugere que o uso de anticoagulantes como a enoxaparina e a hirudina por pacientes submetidos a terapia pró-angiogênica pode ser uma variável relevante para a eficácia destes protocolos, em especial em estudos de fase 1 e 2 que freqüentemente utilizam doses baixas ou sub-terapêuticas. Por outro lado, receptores de trombina nas CE podem ser alvos terapêuticos potenciais para angiogênese terapêutica.



8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275 (5302): 964-7.

Bajnok L, Kozlovsky B, Varga J, Antalffy J, Olvaszto S, Fulop T, Jr. Technetium-99m sestamibi scintigraphy for the assessment of lower extremity ischaemia in peripheral arterial disease. *Eur J Nucl Med* 1994; 21 (12): 1326-32.

Bastaki M, Nelli EE, Dell'Era P, Rusnati M, Molinari-Tosatti MP, Parolini S, et al. Basic fibroblast growth factor-induced angiogenic phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17 (3): 454-64.

Battegay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* 1994; 125 (4): 917-28.

Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97 (12): 1114-23.

Baumgartner I, Rauh G, Pieczek A, Wuensch D, Magner M, Kearney M, et al. Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor. *Ann Intern Med* 2000; 132 (11): 880-4.

Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1995; 21 (2): 314-24; discussion 24-5.

Beaglehole R, Irwin A, Prentice T. The World Health Report - Shaping the future. World Health Organization. Geneva, p.204. 2003

Beanlands RS, Dawood F, Wen WH, McLaughlin PR, Butany J, D'Amati G, et al. Are the kinetics of technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile affected by cell metabolism and viability? *Circulation* 1990; 82 (5): 1802-14.

Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998; 125 (9): 1591-8.

Bobek V, Taltynov O, Pinterova D, Kolostova K. Gene therapy of the ischemic lower limb-
-Therapeutic angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 2006; 44 (6): 395-405.

Brevetti LS, Paek R, Brady SE, Hoffman JI, Sarkar R, Messina LM. Exercise-induced hyperemia unmasks regional blood flow deficit in experimental hindlimb ischemia. *J Surg Res* 2001; 98 (1): 21-6.

Briguori C, Testa U, Colombo A, Petrucci E, Condorelli G, Airolidi F, et al. Relation of various plasma growth factor levels in patients with stable angina pectoris and total occlusion of a coronary artery to the degree of coronary collaterals. *Am J Cardiol* 2006; 97 (4): 472-6.

Brothers TE, Robison JG, Sutherland SE, Elliott BM. Racial differences in operation for peripheral vascular disease: results of a population-based study. *Cardiovasc Surg* 1997; 5 (1): 26-31.

Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmback K, Danton MJ, et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (13): 6258-63.

Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 2003; 9 (5): 604-13.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9 (6): 653-60.

Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383 (6595): 73-5.

Carmeliet P, Moons L, Dewerchin M, Mackman N, Luther T, Breier G, et al. Insights in vessel development and vascular disorders using targeted inactivation and transfer of vascular endothelial growth factor, the tissue factor receptor, and the plasminogen system. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 811: 191-206.

Caunt M, Huang YQ, Brooks PC, Karparkin S. Thrombin induces neoangiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J Thromb Haemost* 2003; 1 (10): 2097-102.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288 (5466): 669-72.

Challiss RA, Hayes DJ, Petty RF, Radda GK. An investigation of arterial insufficiency in rat hindlimb. A combined ³¹P-n.m.r. and bloodflow study. *Biochem J* 1986; 236 (2): 461-7.

Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther* 2003; 8 (3): 495-500.

Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998; 125 (4): 725-32.

Collen A, Smorenburg SM, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C, et al. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res* 2000; 60 (21): 6196-200.

Comerota AJ, Throm RC, Miller KA, Henry T, Chronos N, Laird J, et al. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J Vasc Surg* 2002; 35 (5): 930-6.

Connolly AJ, Suh DY, Hunt TK, Coughlin SR. Mice lacking the thrombin receptor, PAR1, have normal skin wound healing. *Am J Pathol* 1997; 151 (5): 1199-204.

Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 1996; 2 (2): 209-15.

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

Cooper LT, Jr., Hiatt WR, Creager MA, Regensteiner JG, Casscells W, Isner JM, et al. Proteinuria in a placebo-controlled study of basic fibroblast growth factor for intermittent claudication. *Vasc Med* 2001; 6 (4): 235-9.

Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; 407 (6801): 258-64.

Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 1995; 270 (5235): 404-10.

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87 (7): 1161-9.

de Godoy JM, de Godoy MF, Batigalia F, Travolo AR, Monteiro EH. Lower-extremity amputation: a 6-year follow-up study in Brazil. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2005; 13 (2): 164-6.

De Marchis F, Ribatti D, Giampietri C, Lentini A, Faraone D, Scoccianti M, et al. Platelet-derived growth factor inhibits basic fibroblast growth factor angiogenic properties in vitro and in vivo through its alpha receptor. *Blood* 2002; 99 (6): 2045-53.

Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, Itin A, Fishman GI, Carmeliet P, et al. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *Embo J* 2002; 21 (8): 1939-47.

Dormandy J, Mahir M, Ascady G, Balsano F, De Leeuw P, Blombery P, et al. Fate of the patient with chronic leg ischaemia. A review article. J Cardiovasc Surg (Torino) 1989; 30 (1): 50-7.

Dormandy JA, Thomas PR. What is the natural history of critically ischemic patient with and without his leg? In: Greenhalgh Rm, Jamieson Cw. Limb Salvage and Amputation for Vascular Disease. Philadelphia: WB Saunders; 1988. p.11-26.

Dregelid E, Larsen T, Sorlie D. Collateral arterial capacity following acute iliac occlusion in the rat. Res Exp Med (Berl) 1983; 182 (2): 177-84.

Faraone D, Aguzzi MS, Ragone G, Russo K, Capogrossi MC, Facchiano A. Heterodimerization of FGF-Receptor 1 and PDGF-Receptor Alpha. A Novel Mechanism Underlying the Inhibitory Effect of PDGF-BB on FGF-2, in Human Cells. Blood 2005:

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 2003; 9 (6): 669-76.

Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J Exp Med 1971; 133 (2): 275-88.

Galasso G, Schiekofer S, Sato K, Shibata R, Handy DE, Ouchi N, et al. Impaired angiogenesis in glutathione peroxidase-1-deficient mice is associated with endothelial progenitor cell dysfunction. Circ Res 2006; 98 (2): 254-61.

Gales-Camus C, Beaglehole R, Epping-Jordan J. Preventing chronic diseases: a vital investment: WHO Global Report. World Health Organization. Geneva, p.200. 2005

Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, 2nd, Libby P. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17 (3): 483-9.

Garcia JG, Pavalko FM, Patterson CE. Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin. Blood Coagul Fibrinolysis 1995; 6 (7): 609-26.

Garcia JG, Schaphorst KL. Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability. *J Investig Med* 1995; 43 (2): 117-26.

Garcia LA. Epidemiology and pathophysiology of lower extremity peripheral arterial disease. *J Endovasc Ther* 2006; 13 Suppl 2: II3-9.

Garcia-Martinez C, Opolon P, Trochon V, Chianale C, Musset K, Lu H, et al. Angiogenesis induced in muscle by a recombinant adenovirus expressing functional isoforms of basic fibroblast growth factor. *Gene Ther* 1999; 6 (7): 1210-21.

Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science* 2001; 293 (5535): 1666-70.

Grim M, Carlson BM. Alkaline phosphatase and dipeptidylpeptidase IV staining of tissue components of skeletal muscle: a comparative study. *J Histochem Cytochem* 1990; 38 (12): 1907-12.

Habib GB, Heibig J, Forman SA, Brown BG, Roberts R, Terrin ML, et al. Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase I thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. The TIMI Investigators. *Circulation* 1991; 83 (3): 739-46.

Hammes HP, Lin J, Renner O, Shani M, Lundqvist A, Betsholtz C, et al. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2002; 51 (10): 3107-12.

Hao X, Mansson-Broberg A, Gustafsson T, Grinnemo KH, Blomberg P, Siddiqui AJ, et al. Angiogenic effects of dual gene transfer of bFGF and PDGF-BB after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315 (4): 1058-63.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79 (4): 1283-316.

Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 2001; 153 (3): 543-53.

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 (10): 1359-65.

Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, et al. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *Am Heart J* 2001; 142 (5): 872-80.

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5 (12): 1806-14.

Huang YQ, Li JJ, Hu L, Lee M, Karparkin S. Thrombin induces increased expression and secretion of VEGF from human FS4 fibroblasts, DU145 prostate cells and CHRF megakaryocytes. *Thromb Haemost* 2001; 86 (4): 1094-8.

Huang YQ, Li JJ, Hu L, Lee M, Karparkin S. Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 2002; 99 (5): 1646-50.

Huber TS, Wang JG, Wheeler KG, Cuddeback JK, Dame DA, Ozaki CK, et al. Impact of race on the treatment for peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Surg* 1999; 30 (3): 417-25.

Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; 348 (9024): 370-4.

Isner JM, Rosenfield K. Redefining the treatment of peripheral artery disease. Role of percutaneous revascularization. *Circulation* 1993; 88 (4 Pt 1): 1534-57.

Isner JM, Vale PR, Symes JF, Losordo DW. Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ Res* 2001; 89 (5): 389-400.

Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 2004; 20 (11): 563-9.

Khan TA, Sellke FW, Laham RJ. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia. *Gene Ther* 2003; 10 (4): 285-91.

Kiat H, Maddahi J, Roy LT, Van Train K, Friedman J, Resser K, et al. Comparison of technetium 99m methoxy isobutyl isonitrile and thallium 201 for evaluation of coronary artery disease by planar and tomographic methods. *Am Heart J* 1989; 117 (1): 1-11.

Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 2000; 95 (1): 189-97.

Kusumanto YH, Weel VV, Mulder NH, Smit AJ, Dungen JJ, Hooymans JM, et al. Treatment with Intramuscular Vascular Endothelial Growth Factor Gene Compared with Placebo for Patients with Diabetes Mellitus and Critical Limb Ischemia: A Double-Blind Randomized Trial. *Hum Gene Ther* 2006:

Laham RJ, Chronos NA, Pike M, Leimbach ME, Udelson JE, Pearlman JD, et al. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36 (7): 2132-9.

Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 2002; 359 (9323): 2053-8.

Lee CW, Stabile E, Kinnaird T, Shou M, Devaney JM, Epstein SE, et al. Temporal patterns of gene expression after acute hindlimb ischemia in mice: insights into the genomic program for collateral vessel development. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43 (3): 474-82.

Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 1994; 8 (16): 1875-87.

Mack CA, Magovern CJ, Budenbender KT, Patel SR, Schwarz EA, Zanzonico P, et al. Salvage angiogenesis induced by adenovirus-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor protects against ischemic vascular occlusion. *J Vasc Surg* 1998; 27 (4): 699-709.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277 (5322): 55-60.

Makinen 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 (1): 127-33.

Management of peripheral arterial disease. TransAtlantic Inter-Society Consensus. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; 19 Suppl A: S144-243.

Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; 12 (3): 342-7.

Moser M, Patterson C. Thrombin and vascular development: a sticky subject. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23 (6): 922-30.

Mousa SA, Mohamed S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2004; 92 (3): 627-33.

Nagy JA, Brown LF, Senger DR, Lanir N, Van de Water L, Dvorak AM, et al. Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochim Biophys Acta* 1989; 948 (3): 305-26.

Nowygrod R, Egorova N, Greco G, Anderson P, Gelijns A, Moskowitz A, et al. Trends, complications, and mortality in peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg* 2006; 43 (2): 205-16.

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

Paek R, Chang DS, Brevetti LS, Rollins MD, Brady S, Ursell PC, et al. Correlation of a simple direct measurement of muscle pO₂ to a clinical ischemia index and histology in a rat model of chronic severe hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 2002; 36 (1): 172-9.

Palmer-Kazen U, Wariaro D, Luo F, Wahlberg E. Vascular endothelial cell growth factor and fibroblast growth factor 2 expression in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2004; 39 (3): 621-8.

Plante GE, Perreault M, Lanthier A, Marette A, Maheux P. Reduction of endothelial NOS and bradykinin-induced extravasation of macromolecules in skeletal muscle of the fructose-fed rat model. *Cardiovasc Res* 2003; 59 (4): 963-70.

Post MJ, Laham R, Sellke FW, Simons M. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovasc Res* 2001; 49 (3): 522-31.

Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16 (2): 159-78.

Pu LQ, Sniderman AD, Brassard R, Lachapelle KJ, Graham AM, Lisbona R, et al. Enhanced revascularization of the ischemic limb by angiogenic therapy. *Circulation* 1993; 88 (1): 208-15.

Rajagopalan S, Mohler ER, 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, et al. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003; 108 (16): 1933-8.

Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80 (1-2): 148-58.

Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 1999; 99 (1): 111-20.

Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71 (4): 1207-10.

Russo K, Ragone R, Facchiano AM, Capogrossi MC, Facchiano A. Platelet-derived growth factor-BB and basic fibroblast growth factor directly interact in vitro with high affinity. *J Biol Chem* 2002; 277 (2): 1284-91.

Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T, et al. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34 (7): 775-87.

Schultz A, Lavie L, Hochberg I, Beyar R, Stone T, Skorecki K, et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 1999; 100 (5): 547-52.

Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia. *Circulation* 1991; 84 (4 Suppl): IV1-26.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219 (4587): 983-5.

Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 1996; 149 (1): 293-305.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376 (6535): 62-6.

Shimpo M, Ikeda U, Maeda Y, Takahashi M, Miyashita H, Mizukami H, et al. AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc Res* 2002; 53 (4): 993-1001.

Shinbrot E, Peters KG, Williams LT. Expression of the platelet-derived growth factor beta receptor during organogenesis and tissue differentiation in the mouse embryo. *Dev Dyn* 1994; 199 (3): 169-75.

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103 (23): 2776-9.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359 (6398): 843-5.

Shyu KG, Chang H, Isner JM. Synergistic effect of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor on neoangiogenesis in hypercholesterolemic rabbit model with acute hindlimb ischemia. *Life Sci* 2003; 73 (5): 563-79.

Sola F, Gualandris A, Belleri M, Giuliani R, Coltrini D, Bastaki M, et al. Endothelial cells overexpressing basic fibroblast growth factor (FGF-2) induce vascular tumors in immunodeficient mice. *Angiogenesis* 1997; 1 (1): 102-16.

Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* 1994; 8 (16): 1888-96.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87 (7): 1171-80.

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 (3): 547-52.

Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation* 1994a; 90 (5 Pt 2): II228-34.

Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994b; 93 (2): 662-70.

Tang GL, Chang DS, Sarkar R, Wang R, Messina LM. The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 2005; 41 (2): 312-20.

Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999; 286 (5449): 2511-4.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266 (18): 11947-54.

Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ, Jr. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 1996; 88 (5): 1583-7.

Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem* 1999; 274 (34): 23969-76.

Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; 94 (12): 3281-90.

Unger EF, Goncalves L, Epstein SE, Chew EY, Trapnell CB, Cannon RO, 3rd, et al. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2000; 85 (12): 1414-9.

Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60 (2): 203-12.

Wachtel MS. Family poverty accounts for differences in lower-extremity amputation rates of minorities 50 years old or more with diabetes. *J Natl Med Assoc* 2005; 97 (3): 334-8.

Walder CE, Errett CJ, Bunting S, Lindquist P, Ogez JR, Heinsohn HG, et al. Vascular endothelial growth factor augments muscle blood flow and function in a rabbit model of chronic hindlimb ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27 (1): 91-8.

Wang HS, Li F, Runge MS, Chaikof EL. Endothelial cells exhibit differential chemokinetic and mitogenic responsiveness to alpha-thrombin. *J Surg Res* 1997; 68 (2): 139-44.

Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998; 93 (5): 741-53.

Wang Y, Zhen Y, Shi Y, Chen J, Zhang C, Wang X, et al. Vitamin k epoxide reductase: a protein involved in angiogenesis. *Mol Cancer Res* 2005; 3 (6): 317-23.

Wivel NA, Walters L. Germ-line gene modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives. *Science* 1993; 262 (5133): 533-8.

Wolff J, Lewis DL, Herweijer H, Hegge J, Hagstrom J. Non-viral approaches for gene transfer. *Acta Myol* 2005; 24 (3): 202-8.

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 (4949 Pt 1): 1465-8.

Xue J, Wu Q, Westfield LA, Tuley EA, Lu D, Zhang Q, et al. Incomplete embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (13): 7603-7.

Yla-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003; 9 (6): 694-701.

Yoshida J, Ohmori K, Takeuchi H, Shinomiya K, Namba T, Kondo I, et al. Treatment of ischemic limbs based on local recruitment of vascular endothelial growth factor-producing inflammatory cells with ultrasonic microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46 (5): 899-905.

Ziada AM, Hudlicka O, Tyler KR, Wright AJ. The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res* 1984; 18 (12): 724-32.

Zucker S, Conner C, DiMassmo BI, Ende H, Drews M, Seiki M, et al. Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; 270 (40): 23730-8.

Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998; 75 (5): 780-6.



9- ANEXOS

Animal Models

Early *in vivo* anticoagulation inhibits the angiogenic response following hindlimb ischemia in a rodent model

Erich V. De Paula¹, Mariane C. F. Nascimento¹, Celso D. Ramos², Margareth C. Ozelo¹, Tânia F. Machado¹, Ana T. Guillaumon², Valder R. Arruda³, Joyce M. Annichino-Bizzacchi^{1,2}

¹Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ²State University of Campinas School of Medicine, Campinas, SP, Brazil; ³Department of Pediatrics, University of Pennsylvania School of Medicine, The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania, USA

Summary

Emerging findings have demonstrated the critical role of blood clotting factors in the formation and stabilization of embryonic blood vessels. Whether a similar role is true during post-natal angiogenesis remains to be determined. Here we sought to determine whether the suppression of thrombin generation with anticoagulant drugs at doses routinely used for therapeutic purposes would affect the angiogenesis pattern following hindlimb ischemia in rats. Animals were treated with r-hirudin or enoxaparin within six hours post induction of hindlimb ischemia, whereas two other groups received oral anticoagulation warfarin beginning at day 3 post-ischemia or saline (as control). The revascularization anatomical and functional responses were evaluated 30 days following tissue ischemia. Chronic adminis-

tration of the drugs resulted in stable anticoagulation in all animals throughout the experiment. Animals that received drugs with fast anticoagulation effects (i.e. r-hirudin and enoxaparin) presented a significant decrease in capillary density and capillary-to-myocyte ratio compared to control animals. These effects were not associated with changes in relative perfusion of the hindlimb at steady state. These anti-angiogenic effects occur in a time-dependent manner; since delayed inhibition of coagulation (> 72 hours) presents no adverse effect on the angiogenic response. We conclude that the use of anticoagulant drugs immediately after tissue ischemia induction hampers *in vivo* angiogenic response in a rodent hindlimb ischemia model.

Keywords

Angiogenesis, warfarin, hirudin, heparin, anticoagulant

Thromb Haemost 2006; 96: 68–72

Introduction

In the last two decades, advances in the understanding of the molecular and cellular events associated with the development of the cardiovascular system made possible the use of vascular growth factors with the aim to increase vascular supply to ischemic tissues. These strategies, collectively known as “therapeutic angiogenesis”, have been already evaluated in phase II clinical trials, and are attractive alternatives for the treatment for patients with arterial occlusive disease (AOD) (1).

More recently, growing evidence demonstrated the essential role of blood clotting factors and their receptors during the normal process of embryonic vascular development. For example, mice engineered by disruption of endogenous procoagulant factors such as prothrombin and factor V, protease-activated receptor-1 (PAR-1) or tissue factor presented embryonic mortality due

to bleeding and/or lack of vascular integrity (2–6). Furthermore, detailed *in vitro* studies have also demonstrated the role of thrombin in different critical steps of angiogenesis (7).

Taken together, these data emphasize the importance of thrombin in angiogenesis during embryonic development, and raise questions on whether there would be an analogous role for thrombin in situations when adult angiogenesis is upregulated such as inflammation, tumour development, and in AOD.

To date, there is limited information on the *in-vivo* role of thrombin in adult angiogenesis. However, a series of *in-vitro* studies clearly demonstrated that drugs with different anticoagulant effects and molecular structures such as heparin, heparin-derivatives and hirudin (a thrombin-specific inhibitor) all present inadvertent anti-angiogenic responses that do not depend on the anticoagulant effect. Moreover, inhibition of vitamin K epoxide reductase expression in human umbilical vein endothelial cells

Correspondence to:
Valder R. Arruda, MD, PhD
The Children's Hospital of Philadelphia
302F – Abramson Research Center
34th St. and Civic Center Blvd.
Philadelphia, PA 19104–4399, USA
Tel.: +1 215 590 4907, Fax: +1 215 590 3660
E-mail: arruda@email.chop.edu

Financial support:
This work was supported by grants from FAPESP to JMAB.

Received February 20, 2006
Accepted after resubmission May 24, 2006

Prepublished online June 14, 2006 doi:10.1160/TH06-02-0103

(HUVEC) by treatment with antisense oligonucleotides also inhibits angiogenesis (8). Based on these findings, we sought to determine whether the use of these common anticoagulant drugs would affect the parameters of therapeutic angiogenesis. Because patients with AOD are likely to require anticoagulant therapy when enrolled in clinical studies on therapeutic angiogenesis, we carried out in-vivo experiments on the effect of anticoagulant drugs in the hindlimb ischemia model in rats.

Materials and methods

Hindlimb ischemia model

All animal experiments were approved by the local Animal Experiments Ethical Committee, and complied with the regulations of the Brazilian Council of Animal Experimentation. The hindlimb ischemia model was performed as previously described (9). Briefly, eight-week-old Lewis rats were anesthetized by intravenous pentobarbital (30–50 mg/kg). All branches of the right femoral artery distal to the inguinal ligament were ligated, and the whole artery was surgically excised to induce limb ischemia. Rats were fed standard rat chow *ad libitum*, and were evaluated for clinical signs of ischemia according to a previously published clinical ischemia index (10) (abnormal gait, pale feet, pressure sores or tissue necrosis) at days 7, 14, and 28.

Anticoagulation protocol, blood samples and tissue collection

Animals were allocated to one of the three treatment groups: 1) sodium warfarin (Zest Farmaceutica, Rio de Janeiro, Brazil) 0.2 mg/kg diluted in distilled water, given orally from day 3 to day 30 after surgery (n=6); 2) recombinant hirudin (r-hirudin) (Lepirudin, Hoechst Marion Roussel, Kansas City, MO, USA) 2.5 mg/kg s.c. from day 1 (six hours after surgery) to day 30 after surgery (n=5); and 3) the low-molecular-weight heparin (LMWH) enoxaparin (Aventis Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, NJ, USA) at the fixed dose of 1,500 U/kg s.c. from day 1 (six hours after surgery) to day 30 after surgery (n=5). Preliminary studies on the use of warfarin prior to hindlimb ischemia were associated with an unacceptably high mortality rate due to surgical bleeding (n=2/2). Similarly, attempts in targeting specifically factor Xa, by injecting tick anticoagulant peptide (kindly provided by Dr. Krishnasamy, University of Pennsylvania) by intravenous or subcutaneous routes, proved complicated because of the drugs short half-life (< 15 min) and high risk of surgical bleeding. In preliminary experiments, the r-hirudin regimen used in the study resulted in an aPTT 1.5- to 2.5-fold longer than baseline (four hours after each dose), which was the target aPTT for r-hirudin-treated animals. Control animals (n=6) received water on the same schedule as warfarin. Blood samples (270 µl of whole blood) were collected into 1.5-ml plastic tubes containing 3.2% sodium citrate solution by tail vein puncture on days 7, 14, 21 and 28 for adjustment of anticoagulant dose from control and warfarin-treated animals. The anticoagulation target level was a prothrombin time (PT) two- to three-fold longer than baseline. The PT and aPTT target levels were chosen for being well established levels of anticoagulation in clinical settings. Two additional blood samples were also collected from r-hirudin-treated animals on days 7 and 14 for aPTT determination. On

day 30, all animals were anesthetized as described above, and 3.5 ml of whole blood was collected into 3.2% sodium citrate glass tubes by abdominal aortic puncture. After centrifugation, samples were stored at –80°C until analysis. Animals were then sacrificed by intravenous infusion of 200 mg/kg of pentobarbital, the abdominal aorta was catheterized, and the hindlimbs were perfused with 20 ml of a 500 U/ml saline solution of sodium heparin to prevent post mortem clot formation. The semimembranosus muscles of the ischemic limbs were harvested, embedded in optimum cutting temperature compound (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, USA), snap-frozen in liquid nitrogen cooled n-hexane, and stored at –80°C. The semimembranosus muscle was chosen, because i) it is the major muscles of the medial thigh, and ii) it was originally perfused by the deep femoral artery, ligated at the time that the femoral artery was excised (11).

Blood coagulation parameters

The PT assay was performed using 50 µl of sample mixed with 37°C pre-warmed thromboplastin (Simplastin Excel S; BioMérieux Inc., Durham, NC, USA). The aPTT assay was performed using 50 µl of sample, mixed with 50 µl of aPTT reagent (Platelin LS; BioMérieux Inc.). Both assays were performed in a coagulometer (Coag-A-mate MTX; Organon Teknika, Turnhout, Belgium). FVII clotting activity was determined on a similar PT-based assay using 50 µl sample mixed with 50 µl of human FVII deficient plasma (Dade-Behring, Marburg, Germany) at 37°C. FII, FIX and FX clotting activities were determined by aPTT-based assays performed using 50 µl of sample, mixed with 50 µl of human FII (Diamed AG, Switzerland), FIX or FX deficient plasma (Dade-Behring) and 50 µl aPTT reagent (Platelin LS; bioMérieux Inc.). Heparin concentration in enoxaparin treated animals was determined by an anti-FXa based assay (Accucolor Heparin; Sigma, St. Louis, MO, USA).

Hindlimb relative perfusion evaluation

To evaluate the effect of anticoagulant drugs on limb perfusion parameters of treated and control animals, we performed 99mTc-sestamibi scintigraphy of both hindlimbs on day 28, as previously described (12). Briefly, anterior and posterior static images were obtained under pentobarbital anesthesia five minutes after an intravenous injection of 55 MBq (1.5 mCi) of 99mTc-sestamibi using a two-head gamma-camera. Regions of interest were drawn over both hindlimbs on the anterior and posterior images for uptake quantification, and the contra lateral hindlimb was used as a reference. The mean count of the anterior and posterior was calculated, and the ratios between ischemic and normal hindlimbs (I/N) were calculated for each animal. An examiner who was blinded to which group the images belonged performed the evaluation. This method has been previously correlated with blood flow measurements using 15 µm fluorescent microspheres (data not shown), which further support the use of such methodology to assess parameters of limb circulation.

Capillary density and capillary-to-myocyte ratio

Capillary density was evaluated to determine whether the angiogenesis response *in vivo*, represented by proliferation of small capillary vessels in the ischemic hindlimb, would be affected by

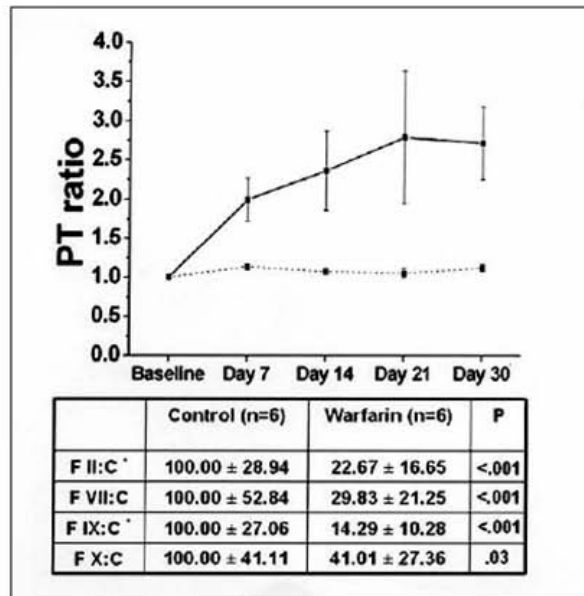


Figure 1: Coagulation parameters of warfarin-treated and control rats. A) Prothrombin time (PT) ratios for control (dotted line; n=6) and warfarin-treated animals (bold line; n=6) before and at several time points after hindlimb ischemia. B) At day 30, all vitamin K-dependent procoagulant factors were significantly down-regulated in warfarin-treated animals compared to controls ($P < 0.05$; Mann-Whitney test). Results expressed as percentage of the mean value obtained in control rats $\pm$ SEM.

the anticoagulant drugs. On day 30 of the experiment, 7 μ m-thick cryosections of the midportion of the semimembranosus muscle from the ischemic hindlimb were obtained and stained for alkaline phosphatase with an indoxyl-tetrazolium method as previously described (13). Briefly, samples were stained for 1 h at 37°C in a solution of nitroblue tetrazolium (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) 30 mg, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p toluidine salt (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) 6 mg, in 30 ml of a buffer containing 6.9 mM $MgSO_4$ and 27.5 mM $NaBO_2$ adjusted to a pH between 9.2 and 9.4 with boric acid. After rinsing and a five-minute post fixation with sucrose (300 mOsmol; Sigma-Aldrich Co.) buffered formalin solution (Accustain; Sigma-Aldrich Co.), sections were counterstained with 0.5% eosin. This histochemical staining allows the visualization of capillary endothelial cells in skeletal muscle sections and has been extensively used for the quantification of capillary density in skeletal muscle (14, 15). The muscle sections were then analyzed under 50X magnification, and consecutive fields from each section were digitalized (Kontron KS 300 V2.00 digital imaging system, Munich, Germany), so that the whole area of the section was evaluated (mean number of fields counted per section = 8.2). Image analyses software (Scion Image Beta 4.02 for Windows; Scion Corporation, USA) was used to count the number of capillaries per section, after results in 10 random fields agreed with those obtained with manual counting. Capil-

lary-to-myocyte ratio was also evaluated to prevent an overestimation of capillary proliferation secondary to uneven myocyte atrophy in the experimental groups. The number of myofibers was manually counted in five random fields per tissue section per animal. Finally, the mean number of capillaries/mm² (capillary density) and the capillary-to-myocyte ratio was calculated. Again, the observer was blinded as to which treatment group each animal belonged to.

Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). The statistical significance of differences in the study was evaluated by non-parametric tests (Kruskal-Wallis test or Mann-Whitney test). Differences were considered statistically significant for p-values ≤ 0.05 .

Results

Continuous treatment with warfarin, r-hirudin or enoxaparin resulted in sustained and clinically relevant anticoagulant effect in rats

In warfarin treated animals, PT values ranged from 1.39– to 2.87-fold longer than baseline values by day 7 (baseline PT of six untreated animals was 14.7 ± 0.4 seconds). With a further increase of 25–30% in the warfarin dose per kilo, an anticoagulant effect was uniformly obtained, with long-term maintenance doses ranging from 0.25 mg/kg to 0.37 mg/kg daily (Fig. 1). At day 30, PT values were consistently two-fold higher among treated animals compared to controls, and vitamin K-dependent (VKD) procoagulant protein (factor II, VII, IX and X) levels were significantly reduced (ranging from 2.3– to 6-fold) in all treated animals when compared to controls (Fig. 1). In r-hirudin treated animals, aPTT values obtained four hours after the last dose were consistently 1.5–2.7 longer than baseline values (baseline aPTT six untreated animals was 13.2 ± 0.7 seconds) at day 7 (26.2 ± 2.8 seconds) and day 14 (26.6 ± 1.4 seconds). In enoxaparin treated rats, a mean heparin level of 0.50 ± 0.04 U/ml was obtained at day 30. One animal in the enoxaparin group experienced a minor subcutaneous hematoma in the injection site, and one animal in the r-hirudin group died with diffuse bleeding in the third week of the experiment. An additional animal died of anesthetic complications immediately after the 99mTc-sestamibi scintigraphy evaluation (enoxaparin group).

Effective anticoagulation does not influence functional parameters of the physiological revascularization response that follows hindlimb ischemia in rats

Following the initial surgical removal of the right femoral artery, signs of ischemia were observed in all animals by day 7. These findings slowly returned to normal by day 14, and at day 28 clinical signs of ischemia were completely reversed in all treated and control animals. There were no differences between the groups regarding the pattern of resolution of these signs. In accordance with this data, no difference in relative perfusion was detected at day 28 between animals chronically treated with warfarin (I/N ratio = 0.76 ± 0.02 ; n=6), r-hirudin (I/N ratio = 0.72 ± 0.04 ; n=4) or enoxaparin (I/N ratio = 0.81 ± 0.04 ; n=5) when compared to control animals (I/N ratio = 0.72 ± 0.03 ; n=6 – $P = .28$; Kruskal-Wal-

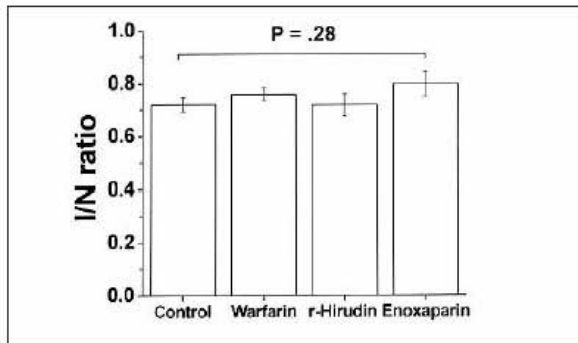


Figure 2: Determination of the blood flow by ^{99m}Tc -sestamibi scintigraphy following hindlimb ischemia. Relative perfusion expressed as the ratio between the ischemic and contra lateral hindlimb (I/N). At day 28, skeletal muscle perfusion ratios were similar in all treatment groups compared to control animals ($P=0.28$; Kruskal-Wallis test; $n=5$ for warfarin and control and $n=4$ for r-hirudin and enoxaparin groups). Results are expressed as means $\pm$ SEM.

lis test) (Fig. 2).

Early-onset of thrombin inhibition hampers the angiogenic response in the rat hindlimb ischemia model

The capillary density determined for r-hirudin (181.79 ± 7.83 capillaries/ mm^2 ; $n=4$) and enoxaparin (164.83 ± 25.78 capillaries/ mm^2 ; $n=4$) treated animals were significantly lower than that determined for the control group (273.57 ± 25.01 capillaries/ mm^2 ; $n=6$) ($P=.001$ and 0.04 respectively; Mann-Whitney test). In agreement with these observations, the capillary-to-myocyte ratio in r-hirudin (0.56 ± 0.05) and enoxaparin-treated animals (0.71 ± 0.06) were also significantly lower than in control animals (0.99 ± 0.06). In contrast, no statistically significant difference could be demonstrated between warfarin and control animals when these two parameters $\pm$ SEM were evaluated (Fig. 3).

Discussion

The mechanisms by which thrombin participates in angiogenesis have been well documented in mice deficient in blood coagulation proteases, PAR-1 or tissue factor (2–6). Moreover, a series of detailed in-vitro experiments demonstrated the essential role of thrombin in several steps of angiogenesis required for the development of a fully functional blood vessel (16–23). Here we sought to determine whether down-regulation of blood coagulation would affect parameters of post-natal angiogenesis responses in adult rats undergone to acute hindlimb ischemia. The main finding of our work was that inhibition of thrombin and/or FXa generation *in vivo* resulted in poor proliferation of small capillaries when anticoagulation is initiated within the first few hours following angiogenic stimuli. Interestingly, no adverse effect on the angiogenic response was detected by delaying the anticoagulation for 72 hours. The time-dependent anti-angiogenic effect documented can be explained by the current notion that the critical molecular and cellular events associated with an-

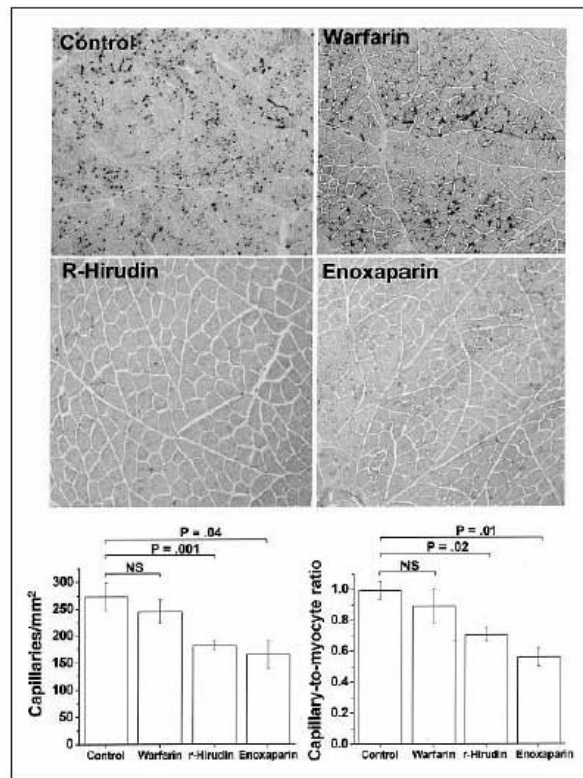


Figure 3: Histochemical analyses of muscle sections at day 30 after hindlimb ischemia. Representative sections of ischemic semimembranosus muscle ($7 \mu\text{m}$) stained by alkaline phosphatase of control, warfarin, r-hirudin and enoxaparin treated animals (Magnification 50X) showing a clear decrease in capillary proliferation among r-hirudin and enoxaparin treated animals, as demonstrated in the bar graph. Results are expressed as means $\pm$ SEM; $n=6$ for control and warfarin groups and $n=4$ for r-hirudin and enoxaparin groups.

giogenesis which take place immediately after the induction of ischemia (24). Therefore, these data suggest the existence of a narrow window of time in which these anticoagulant drugs can modulate angiogenesis.

These experiments were designed to mimic, to a certain extent, clinical situations in which therapeutic angiogenesis would be indicated for patients with severe peripheral or myocardial ischemia. Because these patients often require chronic anticoagulation, we opted to test common drugs that present distinct mechanism of anticoagulation action and differ in their molecular structure. Enoxaparin and hirudin target FXa/thrombin and thrombin, respectively, and both are fast-acting drugs. Taken together these data demonstrate that these in-vivo anti-angiogenesis effects are not drug-specific but rather the outcome of distinct mechanisms as previously reported from in-vitro experiments with both thrombin-specific inhibitors (25) and LMWH (26, 27). By using these drugs, at doses comparable to those already established as therapeutic in humans, we demonstrate that the anti-angiogenic effect of anticoagulant drugs are of concern in

translating this novel therapeutic, i.e. therapeutic angiogenesis, to humans.

The advantage of the current in-vivo model is also demonstrated by experiments with warfarin. When administered 72 hours after ischemia induction, no inhibitory angiogenic effect was documented in animals with sustained long-term anticoagulation. However, Wang et al. recently reported that *in vitro* the down-regulation of vitamin-K epoxide reductase by antisense therapy inhibits HUVEC proliferation independent from the down-regulation of VKD clotting factors (8). Thus, in the presence of warfarin, the therapeutic angiogenic response could be comprised even in the absence of anticoagulant effect. It is possible that warfarin intake prior to the induction of hindlimb ischemia would affect negatively the angiogenic response as well. Further experiments monitoring levels of vitamin-K epoxide reductase post-warfarin intake during hindlimb ischemia will be required.

The hindlimb ischemia model has been used to assess revascularization of ischemic skeletal muscle *in vivo*. In this model, the partial restoration of blood flow that follows hindlimb ischemia is dependent on both angiogenesis (the sprouting of new capillaries from pre-existing vessels) and arteriogenesis (the development of larger and more stable collateral vessels) (28). Here, in addition to an anatomical method that evaluates in-vivo angiogenesis represented by proliferation of small capillaries, we took advantage of a non-invasive technique to assess the blood flow to the ischemic limb. This method allows the evalu-

ation of whole depth muscle resting perfusion. In our study, impaired angiogenesis represented by decreased capillary proliferation was not associated with decreased perfusion in animals receiving early anticoagulation. The major limitation of this method is that all tests are carried out under resting rather than challenged by exercise conditions in the hindlimb ischemia model. It has also been shown that isometric exercise (usually induced by electric stimulation of the ischemic muscles) is capable of unmasking the blood perfusion deficit in the model (29, 30). In addition, these animals do not present chronic occlusive vascular disease that will likely influence the ability of restoring blood flow reserve. Similar experiments using animal models with abnormal blood vessels, such as diabetic, senile and atherosclerosis-prone animals, would be necessary to formally exclude this possibility.

In conclusion, we have shown that the use of anticoagulant drugs at the time of induction of angiogenesis in hindlimb ischemia model hampers the pro-angiogenesis response. Therefore, the clinical outcome of protein- or gene-based early-phase pro-angiogenesis trials, which typically consist of testing subtherapeutic or low doses, could be compromised by concurrent use of these anticoagulant drugs.

Acknowledgement

We thank Junwei Sun for expertise assistance.

References

- Hughes GC, Annex BH. Angiogenic therapy for coronary artery and peripheral arterial disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3: 521-35.
- Sun WY, et al. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7597-602.
- Cui J, et al. Fetal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. *Nature* 1996; 384: 66-8.
- Toomey JR, et al. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 1996; 88: 1583-7.
- Bugge TH, et al. Fetal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6258-63.
- Griffin CT, et al. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science* 2001; 293: 1666-70.
- Rickles FR, et al. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest* 2003; 124: 58S-68S.
- Wang Y, et al. Vitamin K epoxide reductase: a protein involved in angiogenesis. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 317-23.
- Takeshita S, et al. Endothelium-dependent relaxation of collateral microvessels after intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 1998; 98: 1261-3.
- Paek R, et al. Correlation of a simple direct measurement of muscle pO₂ to a clinical ischemia index and histology in a rat model of chronic severe hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 2002; 36: 172-9.
- Takeshita S, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation* 1994; 90: 11228-34.
- Mack CA, et al. Salvage angiogenesis induced by adenovirus-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor protects against ischemic vascular occlusion. *J Vasc Surg* 1998; 27: 699-709.
- Ziada AM, et al. The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res* 1984; 18: 724-32.
- Rissanen TT, et al. Blood flow remodels growing vasculature during vascular endothelial growth factor gene therapy and determines between capillary arterIALIZATION and sprouting angiogenesis. *Circulation* 2005; 112: 3937-46.
- Hudlicka O, et al. The effect of chronic skeletal muscle stimulation on capillary growth in the rat: are sensory nerve fibres involved? *J Physiol* 2003; 546: 813-22.
- Garcia JG, et al. Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6: 609-26.
- Galis ZS, et al. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 483-9.
- Zucker S, et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998; 75: 780-6.
- Huang YQ, et al. Thrombin induces increased expression and secretion of VEGF from human FS4 fibroblasts, DU145 prostate cells and CHRF megakaryocytes. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1094-8.
- Huang YQ, et al. Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 2002; 99: 1646-50.
- Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 23969-76.
- Senger DR, et al. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 1996; 149: 293-305.
- Nagy JA, et al. Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochim Biophys Acta* 1989; 948: 305-26.
- Lee CW, et al. Temporal patterns of gene expression after acute hindlimb ischemia in mice: insights into the genomic program for collateral vessel development. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 474-82.
- Tsopanoglou NE, et al. Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am J Physiol* 1993; 264: C1302-7.
- Collen A, et al. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis *in vitro*. *Cancer Res* 2000; 60: 6196-200.
- Mousa SA, Mohamed S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2004; 92: 627-33.
- Scholz D, et al. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 775-87.
- Brevetti LS, et al. Exercise-induced hyperemia unmasks regional blood flow deficit in experimental hindlimb ischemia. *J Surg Res* 2001; 98: 21-6.
- Walder CE, et al. Vascular endothelial growth factor augments muscle blood flow and function in a rabbit model of chronic hindlimb ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 91-8.