**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LUÍS FERNANDO RESENDE DA SILVA NOMINATO

**Avaliação da transferência gênica por vetor viral na
glândula lacrimal e resposta na neovascularização
corneana**

**RIBEIRÃO PRETO
2017**

LUÍS FERNANDO RESENDE DA SILVA NOMINATO

**Avaliação da transferência gênica por vetor viral na
glândula lacrimal e resposta na neovascularização
corneana**

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

Área de Concentração: Mecanismos
Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-
Vestibular.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha

RIBEIRÃO PRETO

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nominato, Luís Fernando Resende da Silva

Avaliação da transferência gênica por vetor viral na glândula lacrimal e resposta na neovascularização corneana. Luís Fernando Resende da Silva Nominato / Orientador: Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha. Ribeirão Preto, 2017.

57p.: 10il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

1. Terapia gênica. 2. Neovascularização corneana. 3. Glândula lacrimal. 4. Adenovírus. 5. VEGF. 6. sVEGFR1.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Luís Fernando Resende da Silva Nominato

Título: Avaliação da transferência gênica por vetor viral na glândula lacrimal e resposta na neovascularização corneana.

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

Área de Concentração: Mecanismos
Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-
Vestibular.

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta Tese à minha família e aos meus professores.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha, pela paciência na orientação e no incentivo que tornaram possível a conclusão deste desafio. Eu posso afirmar que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem a sua pessoa.

À minha esposa Camila, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigado pelo carinho, amor, pela paciência e pelo companheirismo. Sua presença significou segurança e a certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

Ao meu filho Fernando, que embora não tivesse conhecimento disto, iluminou, de maneira especial, os meus pensamentos, me levando a buscar sempre mais.

Aos meus pais, Emilia e Fernando, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu pudesse chegar até esta etapa da minha vida.

Às minhas irmãs Suelen e Valesca, pelo eterno carinho e apoio.

Ao meu amigo Vinícius, que retirou algumas pedras desse caminho antes da minha caminhada.

Às irmãs Ana Carolina Dias Siqueira e Lara Cristina Dias, amigas mais que essenciais em todos os momentos.

À Lilian, Adriana e Marina, pela amizade e pelo conhecimento técnico, sem o qual este estudo não seria possível.

À Maria Helena (Lenucha), Maria de Fátima e Denny Marcos Garcia, pela presença na Casa 19 e a eterna disposição em ajudar.

Aos Professores Jayter Silva de Paula, João Marcelo Fórtes Furtado e Peter Reinach, pelas conversas e orientações.

Aos funcionários da Cirurgia Experimental da FMRP-USP, em especial aos técnicos Danniely N. S. Barros e José Carlos (Carlinhos) e aos bioteristas Paulo R. Castilho e Ariane M. S. Santana, pela pronta disponibilidade.

Aos funcionários do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP-USP, em especial à Maria Cecília Onofre, por toda orientação e pelo processamento do material.

A todos aqueles que, de alguma forma, estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

Epígrafe

The highest reward for a person's toil is not what they get for it, but what they become by it.

John Ruskin (1819 -1900)

Apoio Financeiro

À CAPES e FAPESP e ao NAP-FTO, pelo apoio financeiro, por toda colaboração e pelos serviços prestados a esta pesquisa.

Resumo

NOMINATO, L.F.R.S. **Avaliação da transferência gênica por vetor viral na glândula lacrimal e resposta na neovascularização corneana.** 2017. 57f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Objetivos: Os objetivos deste estudo foram: 1) determinar a eficácia da transferência gênica do vetor de adenovírus sorotipo 5, carreando o gene do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) solúvel humano (sVEGFR1) para a glândula lacrimal (GL); 2) investigar se a expressão de sVEGFR1 interfere na neovascularização da córnea (NVC), induzida por queimadura alcalina; 3) avaliar a segurança do procedimento. **Métodos:** Trinta e dois ratos Wistar foram submetidos à queimadura central da córnea direita com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M. Os animais foram divididos em três grupos e injetados diretamente em sua GL direita 25 µl de vetores virais AdVEGFR1 (1×10^{10} pfu) (12 animais), 25 µl do vetor AdNull (1×10^{10} pfu) (10 animais), ou 25 µl de solução salina (Controle). Após sete dias, a NVC foi observada e fotografada na lâmpada de fenda. A secreção lacrimal foi medida com fenol. A presença do sVEGFR1 na GL foi testada por qPCR (quantitative polymerase chain reaction) e a coloração, por imunofluorescência. O qPCR foi também utilizado para comparar o RNA mensageiro (RNAm) de interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na GL e no gânglio do trigêmeo (GT). **Resultados:** O vetor AdVEGFR1 transfectou 83% dos ratos. O sVEGFR1 estava presente nas células acinares da GL. A NVC foi prevenida em nove de doze animais do grupo AdVEGFR1, em comparação com o grupo Ad-Null (3:10) e o grupo Controle (1:10) ($p=0,0317$). A secreção lacrimal e o RNAm das citocinas na GL e no GT foram semelhantes nos três grupos ($p>0,05$). **Conclusões:** A transferência gênica do vetor adenoviral para a GL demonstrou expressão local do sVEGFR1 humano, e evitou a NVC na maioria dos olhos expostos a queimaduras alcalinas, se mostrando seguro para a estrutura e função da GL.

Palavras-chave: Terapia gênica. Neovascularização corneana. Glândula Lacrimal. Adenovírus. VEGF. sVEGFR1.

Abstract

NOMINATO, L.F.R.S. **Evaluation of gene transfer by viral vector in the lacrimal gland and response to corneal neovascularization.** 2017. 57f. Thesis (Doctoral). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Purpose: The aims of this study were: 1) to determine the efficacy of adenovirus vector serotype 5 (Ad) encoding human soluble VEGF receptor 1 (sVEGFR1) gene transfer to the lacrimal gland (LG); 2) to investigate whether expression of sVEGFR1 acts in corneal neovascularization (CNV), induced by alkali burn and; 3) to evaluate the safety of the procedure. **Methods:** AdVEGFR1viral vectors (25 μ l, 1×10^{10} pfu) were injected in the right LG of rats and compared with AdNull vector (25 μ l, 1×10^{10} pfu) or 25 μ l saline (Control) before cornea alkali burn with 1 M NaOH. After seven days, CNV was observed and photographed in the slit lamp. Tear secretion was measured with phenol red thread. The animals were tested for human VEGFR1 mRNA and protein in the LG by qPCR and immunofluorescence staining, respectively. qPCR was also used to compare the mRNA of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in LG and ipsilateral trigeminal ganglion (TG). **Results:** Ad-VEGFR1 transfected 83% of the rats. VEGFR1 was present in LG acinar cells. CNV was prevented in 9 of 12 animals of Ad-VEGFR1 group, compared to Ad-Null (3:10) and Control (1:10) ($p=0.0317$). The tear secretion and the cytokines mRNA in LG and TG were similar all three groups ($p>0.05$). **Conclusion:** Adenoviral vector gene transfer to LG as the has shown local expression of human sVEGFR1, as It prevented CNV in most of the eyes exposed to alkali burn and was safe for LG structure and function.

Key words: Gene transfer. Corneal neovascularization. Lacrimal gland. Adenovirus. VEGF. sVEGFR1.

Lista de Figuras

Figura 1 -	(A) Fotografia demonstrando o método de queimadura alcalina com papel filtro embebido em NaOH 1 M; (B) Fotografia da lesão corneana após a queimadura e irrigação com solução salina	31
Figura 2 -	Fotografia demonstrando o método de exposição da GL e injeção direta.....	32
Figura 3 -	Representação esquemática do desenho do estudo.....	32
Figura 4 -	Representação da escala utilizada para a classificação da neovascularização corneana. (*Adaptada de DEUTSCH; HUGHES, 1979)	33
Figura 5 -	Expressão do sVEGFR1 humano na GL de ratos sete dias após injeção direta do vetor recombinante AdVEGFR1, após lesão induzida por álcali. A imunocoloração com Alexa Fluor 647 (vermelho) foi observada no citoplasma de várias células acinares (seta branca) da GL. Não houve imunocoloração positiva para sVEGFR1 humano na GL dos animais dos grupos AdNULL e Controle. Contracoloração nuclear com DAPI (azul).....	39
Figura 6 -	Fotografia da lâmpada de fenda mostrando o desenvolvimento de neovasos na córnea sete dias após a queimadura alcalina e injeção de vetores na glândula lacrimal ipsilateral. (A) Imagem representativa da córnea sem neovascularização (Score 0). É possível ver o reflexo vermelho, a transparência da córnea e os vasos da íris. (B) Imagem representativa da córnea apresentando neovascularização leve (Score 1). Os neovasos são poucos e limitados à periferia da córnea. (C) Imagem representativa da córnea com neovascularização grave (Score 2). Os neovasos são numerosos e atingem o sítio cauterizado. Este modelo foi usado para classificar as outras imagens por similaridade.....	40
Figura 7 -	Comparação da medida de secreção lacrimal do olho direito com Teste do fenol vermelho sete dias após a queimadura alcalina e injeção de vetores na glândula lacrimal ipsilateral. ($p=0,225$, teste de Kruskal-Wallis).....	41
Figura 8 -	Comparação das medidas morfométricas dos ácinos da GL sete dias após a injeção direta do vetor recombinante AdVEGFR1. (A) Coloração de H&E da GL do grupo Controle ($n=10$). (B) Coloração com H&E da GL do grupo AdNULL ($n=10$). (C) Coloração com H&E da GL do grupo sVEGFR1 ($n=12$). (D) Gráfico da medida da área dos ácinos em <i>pixels</i> . ($p=0,2176$,	

teste de Kruskal-Wallis). As setas indicam *lumens* ductais. O círculo indica um ácino 42

Figura 9 - qPCR para marcadores inflamatórios na GL sete dias após a queimadura alcalina e injeção de vetores na GL. A expressão relativa de RNAm de IL-1 β , IL6 e TNF- α foi calculada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A β -actina foi utilizada como gene de referência para normalizar as reações. Os valores de RNAm de IL-1 β , IL-6 e TNF- α não mostraram expressão diferente na GL entre os grupos AdVEGFR1 (n=12), AdNULL (n=10) e Controle (n=10) (p=0,74, 0,90 e 0,97, respectivamente).....43

Figura 10 - qPCR para marcadores inflamatórios no GT sete dias após a queimadura alcalina e injeção de vetores na GL. A expressão relativa de RNAm de IL-1 β , IL6 e TNF- α foi calculada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A β -actina foi utilizada como gene de referência para normalizar as reações. Os valores de RNAm de IL-1 β , IL-6 e TNF- α não mostraram expressão diferente no GT entre os grupos AdVEGFR1 (n=7), AdNULL (n=6) e Controle (n=5) (p=0,80, 0,59 e 0,60, respectivamente).....43

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Expressão do RNAm do sVEGFR1 na GL de ratos sete dias após a injeção direta	38
Tabela 2 - Classificação da neovascularização corneana sete dias após a queimadura alcalina	40

Lista de Siglas e Abreviaturas

%-	Por cento
Ad-	Adenovírus
AdNULL-	Vetor recombinante de adenovírus sem carga genética
AdVEGFR1-	Vetor recombinante de adenovírus capaz de codificar o sVEGFR1
ARVO-	<i>Association of Research in Vision and Ophthalmology</i>
cDNA-	DNA complementar
CETEA-	Comitê de Ética e Pesquisa em Animais
DNA-	Ácido desoxirribonucleico
ELISA-	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FGF-	<i>Fibroblast growth factor</i>
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
g-	Grama
GL-	Glândula Lacrimal
GS-	Glândula Salivar
GT-	Gânglio do trigêmeo
H&E-	Hematoxilina e Eosina
IgG-	Imunoglobulina G
IL-1β-	Interleucina 1 beta
IL-6-	Interleucina 6
l-	Litro
M-	Molar
MG-	Miligrama
ml-	Mililitros
mm-	Milímetros

MMP-	Metaloproteinases
NaOH-	Hidróxido de Sódio
NIDCR-	<i>National Institute of Dental and Craniofacial Research</i>
NIH-	<i>National Institute of Health</i>
NVC-	Neovascularização corneana
°C-	Grau <i>Celsius</i>
PCR-	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF-	Platelet-derived growth fator
PEDF-	<i>Pigment epithelium-derived fator</i>
PFU-	<i>Plaque-forming unit</i>
pg-	Picograma
PIGF-	<i>Placental growth fator</i>
qPCR-	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA-	Ácido ribonucleico
RNA_m-	RNA mensageiro
s-	Segundos
SO-	Superfície ocular
sVEGFR1-	Receptor 1 solúvel de VEGF
NF-α-	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF-	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>Vascular endothelial growth fator</i>)
VEGFR1-	Receptor 1 transmembrana de VEGF
VEGFR2-	Receptor 2 transmembrana de VEGF
VEGFR3-	Receptor 3 transmembrana de VEGF
α-	Alfa
β-	Beta
μL-	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Caracterização da amostra e considerações éticas.....	30
3.2. Vetores de adenovírus recombinante	30
3.3. Procedimento animal.....	30
3.4. Transferência de genes in vivo	31
3.5. Avaliação dos animais.....	32
3.6. Classificação da neovascularização corneana	33
3.7. Medida de secreção lacrimal.....	33
3.8. Quantificação do sVEGFR1 humano no plasma.....	34
3.9. Análise morfológica e imuno-histoquímica da GL.....	34
3.10. PCR quantitativo em tempo real para expressão de RNAm de sVEGFR1, TNF-alfa, IL-6, IL-1beta na GL e no GT	35
3.11. Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Expressão do sVEGFR1 RNAm na GL de ratos tratados com injeção direta de adenovírus recombinante	38
4.2. Expressão do sVEGFR1 humano exógeno na GL de ratos tratados com injeção na GL de Adenovírus recombinante codificando sVEGFR1	38
4.3. Redução da neovascularização corneana induzida por queimadura alcalina em ratos tratados com injeção na GL de Adenovírus recombinante codificando sVEGFR1	39
4.4. Efeitos na função da GL de ratos tratados com injeção de adenovírus recombinante.....	41
4.5. Efeitos na histologia da GL de ratos tratados com injeção de adenovírus recombinante.....	41
4.6. Expressão relativa RNAm das citocinas pró-inflamatórias na GL e no GT	42
4.7. Ausência do sVEGFR1 humano no sangue periférico	43
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
8. ANEXO	56

1- Introdução

O sentido da visão é uma função altamente especializada, e só é possível devido à sofisticada arquitetura do olho. Cada estrutura ocular tem uma distinta organização e função (FERNALD, 2000; QAZI et al., 2010). Para que esse sistema funcione perfeitamente, a córnea, uma lente natural, localizada na parte anterior do olho, necessita permitir a passagem e a refração da luz incidente para a retina. A principal característica da córnea, que permite essa passagem, é a sua transparência (HASSELL; BIRK, 2010; QAZI et al., 2010).

A avascularidade corneana é um dos elementos essenciais na manutenção de sua transparência e ocorre devido ao delicado balanço existente entre fatores pró e antiangiogênicos. Entre os fatores pró-angiogênicos encontram-se o FGF (*fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PlGF (*placental growth factor*), entre outros. Do outro lado, encontram-se os fatores antiangiogênicos: endostatina, angiostatina, PEDF (*pigment epithelium-derived factor*), e diversos anti-VEGF, entre outros (GABISON et al., 2004; LUO et al., 2013).

Diversas condições patológicas, como inflamação, trauma, infecção, hipóxia ou isquemia podem causar o desequilíbrio desse balanço e estimular o desenvolvimento de neovasos em áreas previamente avasculares. Esses vasos anômalos podem, dependendo da extensão, levar a quadros de intensa baixa visual, devido à perda de transparência corneana (CHANG et al., 2001; FORSYTHE et al., 1996).

O mecanismo de criação desses novos vasos sanguíneos é denominado angiogênese e se originam de estruturas vasculares pré-existentes, como os capilares e as vênulas do plexo pericorneano (CURSIEFEN; MARUYAMA; JACKSON, 2006). O processo da angiogênese envolve a degradação da matriz extracelular e da membrana basal vascular por metaloproteinases (MMP), permitindo a migração das células endoteliais e a formação dos novos vasos. A neovascularização é, em grande parte, estimulada pelas ações dos macrófagos que retroalimentam o processo inflamatório, por meio do recrutamento de novos macrófagos, e a produção de fatores pró-angiogênicos; entre eles, o VEGF (QAZI et al., 2010).

O VEGF é um fator de crescimento da subfamília PDGF (*platelet-derived growth factor*). Os fatores de crescimento da família PDGF são proteínas de sinalização importantes que participam nos processos de vasculogênese (a nova formação do sistema circulatório embrionário) e da angiogênese (o crescimento de vasos sanguíneos a partir de vasculatura pré-existente) (CEBE-SUAREZ; ZEHNDER-FJÄLLMAN; BALLMER-HOFER, 2006; TJWA et al., 2003). Nos mamíferos, os VEGFs são codificados por uma família de genes que incluem o VEGF-A,-B,-C,-D e o PIGF (TJWA et al., 2003). Os VEGFs são produzidos por diversos tipos de células, em particular por células do sistema hematopoiético e células endoteliais, quando expostas a situações de hipóxia ou isquemia (FORSYTHE et al., 1996). Todos os membros da família VEGF atuam por ligação aos receptores de VEGF (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), presentes na superfície das células endoteliais. Os VEGFR possuem uma porção extracelular com sete domínios do tipo imunoglobulina, uma região transmembranar, e outra intracelular, que consistem em um domínio tirosina quinase (KLICHE; WALTENBERGER, 2001; SHIBUYA, 2006). O VEGFR1 também existe como forma solúvel (sVEGFR1), gerado por “splicing” alternativo do mesmo pré-RNA (RNA mensageiro), usado para produzir o receptor transmembranar. O sVEGFR1 apresenta apenas a porção extracelular formada por seis domínios (KENDALL; THOMAS, 1993; KLICHE; WALTENBERGER, 2001).

Apesar de o VEGF-A possuir maior afinidade para o VEGFR1 do que para o VEGFR2 (de VRIES et al., 1992), este último é considerado como o principal receptor no processo de neovascularização por mediar quase todas as respostas celulares conhecidas para o VEGF; enquanto que o VEGFR1 parece ter a função de modular a expressão do VEGFR2 (LOHELA et al., 2009). Estudos demonstraram que a ausência do VEGFR2 em embriões de camundongos geraram defeitos logo no início do desenvolvimento de células hematopoiéticas e endoteliais, impossibilitando o desenvolvimento desses embriões (SHALABY et al., 1995); enquanto que, embriões que não expressavam o VEGFR1 apresentaram certa desorganização vascular, porém se desenvolveram (FONG et al., 1999).

O VEGF-C e VEGF-D estão aparentemente relacionados ao processo de linfangiogênese pela ligação com o VEGFR3 (LOHELA et al., 2009; VEIKKOLA et al., 2001).

No passado, as estratégias terapêuticas para inibir a neovascularização focaram apenas no VEGF e no seu receptor funcional VEGFR2, e relativamente pouca atenção era dedicada ao sVEGFR1, uma forma livre da membrana do VEGFR1 (STEVENSON et al., 2012). O receptor de membrana VEGFR1 pertence à família de receptores do tipo III da tirosina quinase. O sVEGFR1 compreende a isoforma extracelular desse receptor. Embora não tenha o domínio transmembranar da tirosina quinase, o sVEGFR1 mantém a capacidade total de ligação do VEGF e possui efeito antiangiogênico potente de ligação do VEGF circulante; inibindo, assim, a ligação com o VEGFR2 (SHIBUYA, 2006). Além disso, é o único inibidor específico conhecido de VEGF endógeno e, assim, tem atraído considerável atenção para as suas potenciais aplicações clínicas na inibição da angiogênese, sendo capaz de antagonizar o VEGF por dois mecanismos: o sequestro de VEGF e a formação de heterodímeros inativos com as isoformas de membrana; resultando na diminuição do VEGF livre, criando um estado antiangiogênico, inibindo a neovascularização (AMBATI et al., 2006; BACHMANN et al., 2009; IRIYAMA et al., 2011; LUO et al., 2013).

Nos últimos anos, o modelo animal mais utilizado para estudar a cicatrização da córnea é a queimadura com substâncias alcalinas, especialmente o hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 1 M (BIAN et al., 2015; FERRARI et al., 2013a,b). A queimadura alcalina da córnea altera o equilíbrio entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos, levando ao predomínio dos fatores angiogênicos. Ferrari et al. (2014) também demonstraram que essas queimaduras apresentam o potencial de afetar à distância o sistema nervoso central, induzindo inflamação do gânglio trigêmeo (GT).

Diversos tratamentos têm sido propostos, incluindo o uso tópico de anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais, fotocoagulação dos neovasos com laser de argônio e terapia fotodinâmica, na tentativa de controlar ou eliminar a neovascularização corneana (NVC). Atualmente, o tratamento padrão tem sido a utilização de corticosteroides tópicos baseado em sua capacidade de diminuir os

eventos inflamatórios (CHANG et al., 2001; MIRABELLI et al., 2014). Infelizmente, todos esses tratamentos, na prática, apresentam resultados insatisfatórios e são responsáveis por diversos efeitos colaterais, como elevação da pressão intraocular e catarata subcapsular posterior (CHANG et al., 2001; MADDALA et al., 2011; MIRABELLI et al., 2014).

O VEGF-A parece ser um alvo adequado para a prevenção e tratamento da neovascularização ocular (CÉBE-SUAREZ; ZEHNDER-FJÄLLMAN; BALLMER-HOFER, 2006; PHILIPP; SPEICHER; HUMPEL, 2000). Estudos demonstraram que o epitélio corneano produz o sVEGFR1, sendo essencial para preservar a avascularidade corneana, uma vez que é capaz de sequestrar e inativar as propriedades angiogênicas do VEGF (AMBATI et al., 2006; SHALABY et al., 1995). Lai et al. (2001) demonstraram que a expressão do sVEGFR1 mediada por adenovírus recombinante foi capaz de inibir o desenvolvimento de NVC quando injetado na câmara anterior de olhos de rato. Esses resultados suportam a utilização de sVEGFR1 na prevenção ou no tratamento da neovascularização.

A transferência gênica por vetor viral é uma estratégia para a produção de peptídeos com potencial terapêutico e a sua aplicação em glândula exócrina possui características de conveniência, entre elas, em tese, o fato de permitir o tratamento de alteração local no órgão alvo, ou nos tecidos servidos pela sua secreção (no caso da glândula lacrimal [GL], a superfície ocular [SO]) (KAGAMI; O'CONNELL; BAUM, 1996; NGUYEN et al., 2011; SAMUNI; BAUM, 2011). A potencialidade da terapia gênica se confirma por resultados de estudos, em que genes de fatores anabólicos e antioxidantes transferidos para a glândula salivar (GS) atuou na prevenção de efeitos deletérios de radioterapia, ou permitiu a suplementação de genes defeituosos para a retina em doenças monogênicas (MIN et al., 2009; ROCHA et al., 2013).

A viabilidade do uso da GL como alvo para transferência gênica foi demonstrada anteriormente pelo nosso grupo em colaboração com os grupos dos Drs. Bruce J Baum e John A. Chiorini, do NIDCR/NIH, quando se conseguiu otimizar a técnica e identificar os melhores sorotipos de vetores para a GL (ROCHA et al., 2011). Da mesma forma, nessa cooperação, foi possível avaliar os

efeitos benéficos da transferência gênica para a GS do hormônio eritropoietina na prevenção do olho seco por radioterapia na GL e na SO. (ROCHA et al., 2011).

Esses dados em conjunto permitiram formular a hipótese de que a GL, a partir da transferência gênica pelo vetor adenovírus recombinante carreando o gene do sVEGFR1, passe a produzir o sVEGFR1; e a secreção desse peptídeo no filme lacrimal possa ter papel terapêutico na prevenção da NVC. A confirmação dessa hipótese poderá apoiar estratégias futuras de modulação de cicatrização, inflamação e/ou neovascularização da SO.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Neste estudo, investigou-se o potencial terapêutico do sVEGFR1 humano na inibição da NVC em ratos submetidos à queimadura alcalina com NaOH, por meio da transferência gênica pelo vetor recombinante adenovírus injetado na GL.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a eficácia da transfecção do adenovírus recombinante para a GL de ratos;
- 2) Analisar o potencial do sVEGFR1 humano, uma vez expresso na GL, para prevenir a NVC;
- 3) Verificar a segurança local e sistêmica do procedimento.

3. Material e Métodos

3.1 Caracterização da amostra e considerações éticas

Foram utilizados ratos machos adultos *Wistar*, com oito semanas de idade, criados no Centro de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais tinham livre acesso à água e ração. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios de cuidados com animais de laboratório (NIH publicação nº 85-23) e as diretrizes da Association of Research in Vision and Ophthalmology (ARVO); e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP (Processo nº 040/2013) (Anexo).

3.2 Vetores de adenovírus recombinante

O adenovírus recombinante do subtipo 5 (AdVEGFR1), carreando o gene humano do receptor 1 de VEGF na sua forma solúvel (sVEGFR1), e o adenovírus recombinante do subtipo 5 (AdNull) sem carga genética, foram fornecidos pela Vector Biolabs (Malvern, PE, EUA) nos títulos de 1×10^{10} PFU (*plaque-forming unit*) / ml.

3.3 Procedimento animal

Os ratos (32 animais) receberam anestesia intramuscular, consistindo de uma combinação de Ketamina (5 mg/100 g de peso corporal) (União Química Farmacêutica SA, Embu-Guaçu, SP) e Xilazina (2 mg/100 g de peso corporal) (Laboratório Callier S.A., Barcelona, Espanha). Após assegurar que os reflexos corneano e caudal foram abolidos, a córnea direita dos animais foi exposta durante 20 segundos a um papel filtro de 2,5 mm embebido em NaOH 1 M e depois irrigada com 60 ml de solução salina normal, de acordo com o método concebido por Ormerod, Abelson e Kenyon (1989) (Figura 1).

Figura 1 - (A) Fotografia demonstrando o método de queimadura alcalina com papel filtro embebido em NaOH 1M. **(B)** Fotografia da lesão corneana após a queimadura e irrigação com solução salina

3.4 Transferência de genes *in vivo*

Para determinar o efeito do sVEGFR1 na prevenção da NVC, os ratos foram divididos em três grupos: AdVEGFR1 (12 animais), AdNull (10 animais) e Controle (10 animais). Sob o mesmo procedimento anestésico, foram injetados cerca de 25 μL do vetor AdVEGFR1 (1×10^{10} pfu / mL), 25 μL do vetor AdNull (1×10^{10} pfu/mL) e 25 μL de solução salina, respectivamente, na GL direita, sob visualização direta após incisão na região temporomandibular direita (Figura 2). As incisões foram seladas com cola de cianoacrilato (ITW PPF Brasil Adesivos Ltda., Valinhos, SP, Brasil). Imediatamente após a recuperação da anestesia, os animais foram alojados (4 animais/gaiola) em ambiente com iluminação controlada e livre acesso à ração e água.

Figura 2 - Fotografia demonstrando o método de exposição da GL e injeção direta

3.5 Avaliação dos animais

Os animais foram observados diariamente até ao 7º dia, quando foram examinados e sacrificados para colheita de tecidos. Um excesso (dobro da dose) de anestesia foi utilizado para a eutanásia (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática do desenho do estudo

3.6 Classificação da neovascularização corneana

No sétimo dia, os animais foram anestesiados e a SO foi avaliada na lâmpada de fenda (Carl Zeiss, modelo 125/16, Oberkochen, Alemanha) e fotodocumentada com uma câmara digital (Sony Corporation, Cyber-Shot DSC-W5 , Tokio, Japão). A presença de NVC foi avaliada, posteriormente, por dois observadores independentes, como descrito anteriormente (DEUTSCH; HUGHES, 1979), e classificada como ausente (0) quando nenhum neovaso era visível, leve (1) quando o crescimento de neovasos sanguíneos se estendia do limbo para a periferia do sítio cauterizado, e grave (2) quando novos vasos sanguíneos atingiram o sítio cauterizado. Os dados categóricos foram analisados entre os três grupos (Figura 4).

Figura 4 - Representação da escala utilizada para a classificação da neovascularização corneana. (*Adaptada de DEUTSCH; HUGHES, 1979)

Neovasos	*Score
Ausência de neovasos	0 (Ausente)
Entre o limbo e a borda da lesão	1 (Leve)
Atingiram a borda da lesão	2 (Grave)

3.7 Medida de secreção lacrimal

O teste do fenol vermelho (“Red Phenol Test”) (Showa Yakuhin Kako Co; Ltd, Tokyo, Japan & Menicon USA Inc., Clovis, CA, USA) foi utilizado para quantificar em milímetros (mm) a secreção lacrimal do olho direito dos animais. O

teste foi realizado colocando-se uma extremidade do cordão (impregnado com vermelho de fenol, um indicador de pH, que muda de amarelo para vermelho quando absorve a lágrima, que é ligeiramente alcalina) no saco conjuntival dos animais por 30 segundos.

3.8 Quantificação do sVEGFR1 humano no plasma

Os níveis sistêmicos (plasmáticos) de sVEGFR1 humano foram medidos pela técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). O sangue foi colhido por punção cardíaca e centrifugado a 3000 rpm, por 10 min, a 4°C. O plasma foi obtido e a medição realizada com *kit* ELISA sVEGFR1 humano (Quantikine ELISA, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada por espectrofotometria de luz, no aparelho SpectraMax M3 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA; USA), utilizando uma curva padrão, de acordo com orientações do fabricante do *kit*. Segundo o fabricante, os níveis mínimos detectáveis da proteína sVEGFR1 são 3,5 pg/ml.

3.9 Análise morfométrica e imuno-histoquímica da GL

Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados e os tecidos dos três grupos colhidos para histopatologia e avaliação bioquímica. Metade da GL direita dos ratos dos três grupos foi incluída em meio crioprotetor (O.C.T. Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA), em criomoldes mergulhados em acetona resfriada com gelo seco até o total congelamento e mantidos em -80°C, até o seccionamento. Para cada amostra, três secções de 10 µm de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As secções coradas com H&E foram observadas ao microscópio para avaliação da estrutura glandular e a presença de infiltrados leucocitários.

As fotografias foram tomadas por meio de um microscópio (Leica Microsystems, DM4000 B LED, Wetzlar, Alemanha) e as imagens obtidas com o *software* Leica LAS V4.2 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Todas as fotografias foram

analisadas e descritas por dois pesquisadores independentes que desconheciam o grupo da amostra. Foram analisadas amostras de quatro GL nos grupos Controle e AdNull e cinco GL no grupo AdVEGFR1. Para a descrição histológica e morfométrica, em cada amostra, foram utilizadas três fotografias representativas das secções coradas com H&E. A área de cinco acinos de cada lâmina foi medida (software LAS V4.2, Leica, Wetzlar, Alemanha) e os valores médios obtidos de cada animal foram comparados entre os três grupos. Além disso, para localizar o sVEGFR1 humano, por imunofluorescência, outras três lâminas da GL direita foram incubadas com anticorpo IgG policlonal de cabra anti-VEGFR1/F1 (R & D Systems, Inc, Minneapolis, EUA) à concentração de 1:200, em câmara úmida, durante a noite a 4°C, seguido por incubação com um segundo anticorpo conjugado Donkey anticaprino, ligado ao Alexa Fluor 647 (Jackson Immuno Research, West Gove, PA, EUA), à concentração de 1:500, em temperatura ambiente, durante 1 hora no escuro. As lâminas foram montadas com DAPI Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) utilizado para contracoloração nuclear.

3.10 PCR quantitativo em tempo real para expressão de RNAm de sVEGFR1, TNF-alfa, IL-6, IL-1beta na GL e no GT

A outra metade da GL direita e o GT ipsilateral dos três grupos foram colhidos e imediatamente transferidos para microtubos contendo RNAlater (Ambion, Branchburg, NJ, EUA). Após, as amostras foram armazenadas no freezer a -80°C até o isolamento do RNA total. Todos os procedimentos foram realizados sob condições padrões de *RNase-free* para evitar a contaminação de *RNase* exógena.

O RNA total foi extraído de 50 mg de tecido utilizando *PureLink RNA Mini Kit* (Ambion, Carlsbad, Ca, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotômetro a OD 260/280 (NanoDrop2000c, EUA). O DNA genômico foi removido usando *Kit DNA-free* (Ambion, Carlsbad, CA, EUA). O cDNA foi sintetizado com, respectivamente, 1000 ng e 76 ng do RNA total de GL e GT utilizando o *kit* de transcrição reversa *High-Capacity cDNA*

Reverse Transcription with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EUA).

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi realizado utilizando-se o equipamento ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EUA). As seguintes sondas de hidrólise (Taqman® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, EUA) foram utilizadas neste estudo: Hs01052961_m1 (humano FLT-1), Rn00580432_m1 (rato IL-1 β), Rn01410330_m1 (rato IL-6), Rn99999017_m1 (rato TNF- α -) e Rn00667869_m1 (rato betaactina). Os ciclos de qPCR foram os seguintes: um ciclo de 50°C por 2 minutos, um ciclo de 95°C por 20 segundos, seguido de 50 ciclos de amplificação (95°C por 1 segundo, 60°C por 20 segundos). Cada ensaio de qPCR foi realizado em triplicata. A β -actina foi usada como gene de referência para normalizar as reações. A expressão relativa de RNAm de IL-1 β (interleucina-1 beta), IL6 (interleucina 6) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) foi calculada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Foi realizado teste de eficiência para todas as sondas de hidrólise utilizadas neste estudo, e considerou-se aceitável a eficiência de 90 a 110%. Para verificar a expressão de RNAm FLT1 (sVEGFR1) na glândula lacrimal, aplicou-se a técnica de presença/ausência.

3.11 Análise estatística

Utilizou-se o *software* estatístico/analítico (Prism 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) para a análise estatística. Os dados contínuos foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão da média. As comparações foram realizadas usando o teste de Kruskal-Wallis para dados contínuos e teste de Qui-quadrado para dados categóricos entre os três grupos. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Expressão do sVEGFR1 RNAm na GL de ratos tratados com injeção direta de adenovírus recombinante

O qPCR para sVEGFR1 humano foi realizado para confirmar a expressão do gene sVEGFR1 humano na GL injetada. A expressão do RNAm do sVEGFR1 humano foi observada em 10 de 12 animais no grupo AdVEGFR1, entretanto não foi detectada em nenhum dos animais dos grupos Ad-Null e Controle, corroborando a hipótese de que uma expressão genética poderia ser obtida por meio do vetor recombinante AdVEGFR1, injetado diretamente na GL. A eficiência da transfecção foi de 83,3% (Tabela 1).

Tabela 1 - Expressão do RNAm do sVEGFR1 na GL de ratos sete dias após a injeção direta

	Presença	Ausência	p
Controle	0	10 (100%)	p* < 0,0001
AdNULL	0	10 (100%)	
AdVEGFR1	10 (83%)	2 (17%)	

*Valor obtido por comparação dos três grupos aplicando o teste Qui-quadrado.

4.2 Expressão do sVEGFR1 humano exógeno na GL de ratos tratados com injeção na GL de adenovírus recombinante codificando sVEGFR1

A expressão do peptídeo sVEGFR1 humano foi analisada por imunocoloração fluorescente das GLs excisadas dos três grupos. Utilizando-se um anticorpo específico, o peptídeo sVEGFR1 humano foi observado no citoplasma de várias células acinares da GL do grupo AdVEGFR1, em amostras de cinco de seis ratos injetados, e não foi encontrado em nenhuma das lâminas de GL dos ratos dos grupos AdNULL e Controle (Figura 5).

Figura 5 - Expressão do sVEGFR1 humano na GL de ratos sete dias após injeção direta do vetor recombinante AdVEGFR1, após lesão induzida por álcali. A imunocoloração com Alexa Fluor 647 (vermelho) foi observada no citoplasma de várias células acinares (seta branca) da GL. Não houve imunocoloração positiva para sVEGFR1 humano na GL do animais dos grupos AdNULL e Controle. Contracoloração nuclear com DAPI (azul).

4.3 Redução da neovascularização corneana induzida por queimadura alcalina em ratos tratados com injeção na GL de adenovírus recombinante codificando sVEGFR1

Para testar se o sVEGFR1 humano poderia proteger a córnea contra os danos provocados por queimaduras alcalinas e inibir a formação de neovasos, os animais que receberam o vetor recombinante AdVEGFR1 injetados na GL direita foram comparados no sétimo dia com aqueles que receberam o vetor recombinante AdNull, ou solução salina na GL direita, após a queimadura alcalina da córnea ipsilateral. A observação à lâmpada de fenda mostrou que nove animais do grupo Controle (9:10 ou 90%) e sete do grupo AdNull (7:10 ou 70%) apresentaram resposta de NVC moderada ou grave no sétimo dia após a

queimadura alcalina da córnea. Neovasos sanguíneos puderam ser visualizados, estendendo-se do limbo e atingindo a área cauterizada. (Figura 6). Por outro lado, apenas três animais (3:12 ou 25%) do grupo AdVEGFR1 apresentaram neovascularização moderada a grave; sendo esta proporção significativamente menor quando comparada aos outros grupos ($p=0,0317$, Qui-Quadrado) (Tabela 2).

Figura 6 - Fotografia da lâmpada de fenda mostrando o desenvolvimento de neovasos na córnea sete dias após a queimadura alcalina e injeção de vetores na glândula lacrimal ipsilateral. **(A)** Imagem representativa da córnea sem neovascularização (Score 0). É possível ver o reflexo vermelho, a transparência da córnea e os vasos da íris. **(B)** Imagem representativa da córnea apresentando neovascularização leve (Score 1). Os neovasos são poucos e limitados à periferia da córnea. **(C)** Imagem representativa da córnea com neovascularização grave (Score 2). Os neovasos são numerosos e atingem o sitio cauterizado. Este modelo foi usado para classificar as outras imagens por similaridade

Tabela 2 - Classificação da neovascularização corneana sete dias após a queimadura alcalina

	0 (Ausente)	1/2 (Leve/Grave)	p
Controle	1 (10%)	9 (90%)	$p^* < 0,0317$
AdNULL	3 (30%)	7 (70%)	
AdVEGFR1	9 (75%)	3 (25%)	

*Valor obtido por comparação dos três grupos aplicando o teste Qui-quadrado.

4.4 Efeitos na função da GL de ratos tratados com injeção de adenovírus recombinante

Para avaliar a segurança do procedimento, foram realizados testes que avaliaram o impacto causado na função e estrutura da GL após a injeção de vetores recombinantes de adenovírus. A secreção de lágrimas, medida pelo Teste do fenol vermelho no olho direito, foi utilizada para análise da função da glândula. As medidas não mostraram diferenças significativas entre os grupos estudados ($p=0,225$, teste de Kruskal-Wallis) (Figura 7).

Figura 7 - Comparação da medida de secreção lacrimal do olho direito com Teste do fenol vermelho sete dias após a queimadura alcalina e injeção de vetores na glândula lacrimal ipsilateral ($p=0,225$, teste de Kruskal-Wallis)

4.5 Efeitos na histologia da GL de ratos tratados com injeção de adenovírus recombinante

Após sete dias de única dose injetada diretamente na GL de ratos de AdVEGFR1, AdNull ou solução salina, as medidas morfométricas das estruturas acinares da GL não mostraram diferenças estatísticas entre os três grupos ($p=0,2176$, teste de Kruskal-Wallis) e nenhuma evidência de inflamação ou outras alterações (Figura 8).

Figura 8 - Comparação das medidas morfométricas dos ácinos da GL sete dias após a injeção direta do vetor recombinante AdVEGFR1. **(A)** Coloração com H&E da GL do grupo Controle (n=10). **(B)** Coloração com H&E da GL do grupo AdNULL (n=10). **(C)** Coloração com H&E da GL do grupo sVEGFR1 (n=12). **(D)** Gráfico da medida da área dos ácinos em *pixels* ($p=0,2176$, teste de Kruskal-Wallis). As setas indicam *lumens* ductais. O círculo indica um ácino

4.6 Expressão relativa RNAm das citocinas pró-inflamatórias na GL e no GT

Para avaliar a resposta inflamatória, após a injeção dos vetores recombinantes de adenovírus na GL, tanto local quanto a distância (no sistema nervosa central), realizou-se o qPCR para as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α no tecido da GL direita e no GT ipsilateral. Os valores de RNAm de IL-1 β , IL-6 e TNF- α não mostraram expressão diferente na GL entre os grupos AdVEGFR1 (n=12), AdNULL (n=10) e Controle (n=10) ($p=0,74$, $0,90$ e $0,97$, respectivamente) (Figura 9). Da mesma forma, no GT ipsilateral, os valores de RNAm de IL-1 β , IL-6 e TNF- α também não evidenciaram expressão diferente entre os grupos AdVEGFR1 (n=7), AdNULL (n=6) e Controle (n=5), ($p=0,80$, $0,59$ e $0,60$, respectivamente) (Figura 10).

Figura 9 - qPCR para marcadores inflamatórios na GL sete dias após a queimadura alcalina e injeção de vetores na GL. A expressão relativa de RNAm de IL-1 β , IL6 e TNF- α foi calculada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A β -actina foi utilizada como gene de referência para normalizar as reações. Os valores de RNAm de IL-1 β , IL-6 e TNF- α não mostraram expressão diferente na GL entre os grupos AdVEGFR1 (n=12), AdNULL (n=10) e Controle (n=10) (p=0,74, 0,90 e 0,97, respectivamente)

Figura 10 - qPCR para marcadores inflamatórios no GT sete dias após a queimadura alcalina e injeção de vetores na GL. A expressão relativa de RNAm de IL-1 β , IL6 e TNF- α foi calculada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A β -actina foi utilizada como gene de referência para normalizar as reações. Os valores de RNAm de IL-1 β , IL-6 e TNF- α não mostraram expressão diferente no GT entre os grupos AdVEGFR1 (n=7), AdNULL (n=6) e Controle (n=5) (p=0,80, 0,59 e 0,60, respectivamente)

4.7 Ausência do sVEGFR1 humano no sangue periférico

Para investigar se a transfecção do vetor recombinante AdVEGFR1 para o LG poderia causar disseminação sistêmica, os níveis de sVEGFR1 foram analisados no sangue dos animais dos três grupos (n=5/grupo), pela técnica de ELISA. Nenhuma das amostras atingiu níveis detectáveis ao exame (dados não apresentados).

5. Discussão

O presente estudo demonstrou que o vetor recombinante de adenovírus do subtipo 5, carreando o AdVEGFR1, foi capaz de transfectar células da GL de ratos sem alterar sua morfologia ou função, e que a produção do peptídeo sVEGFR1 humano na GL foi capaz de controlar a NVC.

A NVC é um processo extremamente complicado. De acordo com estudos anteriores, o aumento da expressão de VEGF foi detectada em córneas queimadas por álcali tão cedo quanto três dias (CHANG et al., 2001). Há descrições de várias abordagens interessantes para prevenir ou reverter a NVC (AMPARO et al., 2013; MADDULA et al., 2011; MIRABELLI et al., 2014). O VEGF é um mediador chave da angiogénese (CÉBE-SUAREZ; ZEHNDER-FJÄLLMAN; BALLMER-HOFER, 2006; PHILIPP; SPEICHER; HUMPEL, 2000). Vários autores têm mostrado que é possível inibir a NVC bloqueando ou suprimindo o VEGF. Tipicamente, o método de administração utilizado é a terapia tópica, contudo estudos recentes revelaram que os benefícios terapêuticos deste método de tratamento são modestos e atuam por curto período, necessitando de várias doses ou uso tópico por longos períodos dos fatores anti-VEGF ou esteroides (DOUGHTY; GLAVIN, 2009; STEVENSON et al., 2012).

Os corticosteroides podem suprimir o desenvolvimento de NVC induzida por inflamação, mas são geralmente ineficazes no tratamento da NVC crônica. Além disso, os efeitos colaterais associados ao uso prolongado de corticosteroides (por exemplo, catarata, hipertensão ocular, afinamento da córnea e infecções oportunistas), geralmente tornam essa escolha insustentável (CURSIEFEN et al., 2001). A utilização tópica de inibidores do VEGF, como o ranibizumab ou bevacizumab, parece ser um meio eficaz (STEVENSON et al., 2012). No entanto, vários estudos clínicos relataram complicações locais (por exemplo, defeitos epiteliais e adelgaçamento do estroma corneano) associadas à aplicação de bevacizumab tópico (BOCK et al., 2008; KOENIG et al., 2009).

O presente estudo foi o primeiro a demonstrar a prova de conceito de utilização da terapia gênica com adenovírus recombinante, visando a GL, para prevenir a NVC causada por queimadura alcalina. Utilizou-se a GL como alvo na terapia gênica com o intuito de se verificarem efeitos na SO. Os alvos específicos foram as células acinares da GL. Essas células são responsáveis pela produção e

liberação de uma variedade de proteínas lacrimais: anticorpos, fatores de crescimento e lactoferrina no fluido ocular (ROCHA et al., 2008). A produção adequada e a liberação de fluido lacrimal são essenciais para manter a integridade da superfície corneana e ocular. Voutetakis et al. (2004) demonstraram, em estudos prévios, a possibilidade da utilização da terapia gênica com vetores virais na GS com sucesso. Banin et al. (2003) destacaram a capacidade do vetor adenovírus recombinante de transfectar a GL *in vitro*, utilizando o modelo de dacrioadenite induzida em coelho. Zhu et al. (2003.) relataram também a capacidade do vetor adenovírus recombinante, carreando o gene de inibidor do TNF- α , de promover a recuperação da produção de lágrimas.

Cho et al. (2012) observaram que a estratégia de aumentar os níveis de sVEGFR1 na SO resultou em diminuição da angiogênese corneana em um modelo murino de sutura corneana. Os resultados do presente estudo também demonstraram que a produção do peptídeo sVEGFR1 humano na GL foi capaz de controlar a NVC, uma vez que a porcentagem de animais com neovascularização foi reduzida no grupo tratado com AdVEGFR1, em comparação com o que recebeu AdNull e solução salina.

A terapia gênica ideal deve fornecer genes altamente eficientes para locais específicos sem serem tóxicos para o organismo. Uma vez que a manutenção da produção de lágrimas é essencial para a saúde ocular, questionou-se se a exposição ao vetor adenoviral recombinante afetaria o funcionamento da mesma. Os resultados deste estudo mostraram que a função avaliada pela secreção lacrimal não evidenciou diferenças entre os grupos medidos pelo Teste do Fenol. Esta descoberta está de acordo com estudos anteriores sobre a terapia gênica da GS em ratos, em que doses do adenovírus recombinante subtipo 5 foram capazes de uma transdução eficaz, com pouco ou nenhum efeito na produção de fluido salivar (WANG et al., 2006). Tal como relatado por Rocha et al. (2011), a transfecção da GL de ratos com vários serotipos de vetores de vírus adeno-associados (AAV), a histologia revelou que nem a GL nem as estruturas de SO foram alteradas pela presença de vetores de AAV. Os resultados deste estudo também demonstraram que não houve infiltrado inflamatório e que a arquitetura das células epiteliais acinares ou ductais não se alterou ao se compararem todos

os grupos. Estes dados revelam que a transfecção de adenovírus pode ser utilizada para alterar a expressão de genes na GL sem danos na sua morfologia ou função. Em um modelo de camundongos, a administração intravenosa do sVEGFR1, mediada por adenovírus para tratamento de carcinoma disseminado, induziu toxicidade sistêmica e redução da sobrevivência (MAHASRESHTI et al., 2003). No entanto, no presente estudo não foi possível detectar a presença do sVEGFR1 no soro do grupo transfectado.

A escolha do vetor utilizado é um dos principais determinantes para o sucesso da terapia gênica. No modelo animal deste estudo, utilizou-se o vetor adenovírus recombinante subtipo 5. A NVC induzida pela queima alcalina foi reduzida com sucesso pela técnica de injeção do ADVGFR1 na GL. O adenovírus recombinante foi transferido com sucesso para as células da GL, tais como as células acinares, e produziu a proteína alvo (sVEGFR1). Os resultados demonstraram, assim, que o vetor adenovírus recombinante poderia proporcionar um sistema de administração de genes eficaz para terapia da SO. No entanto, a duração da expressão do gene alvo recombinante por um vetor adenoviral é limitada, com um pico em torno de sete dias após a exposição e duração média de cerca de um mês, de acordo com estudos anteriores (LIU; MURUVE, 2003; UYAMA et al., 2014). No presente estudo, observou-se baixo nível de expressão do sVEGFR1 na células da GL no sétimo dia após a transfecção, apesar da alta concentração utilizada (10^{10}). Estes resultados corroboram os achados de Banin et al. (2003), que detectaram que o vetor adenovírus transfectado em células da GL *in vitro* demonstrou predileção por células mioepiteliais e pouca presença nas células acinares, quando comparado com o vetor viral da varicela. Geralmente, os vetores de adenovírus utilizados em animais imunocompetentes induzem uma forte resposta inflamatória, que tipicamente atinge nível elevado dentro de quatro a sete dias após a introdução do vetor (YANG et al., 1994). Liu et al. (2015) observaram aumento de duas vezes na expressão de TNF- α na córnea, coróide e retina de ratos que receberam doses subconjuntivais de adenovírus recombinante. Portanto, os resultados dos processos inflamatórios, aqui apresentados, são um tanto surpreendentes. Acredita-se que a resposta inflamatória branda se deva ao uso de novas gerações de vetores virais capazes

de gerar redução do nível de inflamação (CAPASSO et al., 2014). Portanto, os vetores adenovírus recombinantes podem não ser adequados para correção, em longo prazo, de perturbações críticas, mas podem ser adequados para estratégias terapêuticas que requerem expressão gênica transitória.

Desse modo, este estudo demonstrou o papel principal do sVEGFR1 no controle da NVC induzida pela queimadura alcalina utilizando-se vetores AdVEGFR1. Estudos adicionais serão necessários para se esclarecer como o sVEGFR1 afeta as várias características da autoimunidade, e em que nível ou tempo. Será necessária, também, observação mais prolongada para determinar o efeito em longo prazo dos vetores adenovirais *per se*. A futura aplicação de vetores AAV, que proporcionam expressão de fator mais estável e persistente, poderia ser uma alternativa no futuro da utilização de terapia gênica na GL.

Finalmente, estes resultados não apenas suportam que os vetores adenovirais são seguros para a estrutura e função da GL, mas também demonstram que utilizando a GL como tecido alvo, a transcrição local de sVEGFR1 pode ser uma abordagem viável para inibir o desenvolvimento da NVC.

6. Conclusões

O presente estudo demonstrou que a terapia com vetor recombinante AdVEGFR1, carreando o gene do sVEGFR1 na GL, é viável, segura e capaz de controlar a NVC causada por queimadura alcalina. Este estudo também abre caminho para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças da SO e da disfunção das GLs.

7. Referências Bibliográficas¹

---

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte I (ABNT) 3ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

AMBATI, B. K. et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 993-997, 2006.

AMPARO, F. et al. Safety and efficacy of the multitargeted receptor kinase inhibitor pazopanib in the treatment of corneal neovascularization. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 1, p. 537, 2013.

BACHMANN, B. O. et al. Transient postoperative vascular endothelial growth factor (VEGF)-neutralisation improves graft survival in corneas with partly regressed inflammatory neovascularisation. **Br J Ophthalmol**, v. 93, n. 8, p. 1075-1080, 2009.

BANIN, E. et al. Gene delivery by viral vectors in primary cultures of lacrimal gland tissue. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 4, p. 1529-1533, 2003.

BIAN, F. et al. Desiccating stress-induced mmp production and activity worsens wound healing in alkali-burned corneas. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 56, n. 8, p. 4908, 2015.

BOCK, F. et al. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 246, n. 2, p. 281-284, 2008.

CAPASSO, C. et al. The evolution of adenoviral vectors through genetic and chemical surface modifications. **Viruses**, v. 6, n. 2, p. 832-855, 2014.

CÉBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJÄLLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 5, p. 601-615, 2006.

CHANG, J. H. et al. Corneal neovascularization. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 12, n. 4, p. 242-249, 2001.

CHO, Y. et al. Vascular endothelial growth factor receptor 1 morpholino decreases angiogenesis in a murine corneal suture model. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 2, P. 685-692, 2012.

CURSIEFEN, C. et al. Impact of short-term versus long-term topical steroids on corneal neovascularization after non-high-risk keratoplasty. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 239, n. 7, p. 514-521, 2001.

CURSIEFEN, C.; MARUYAMA, K.; JACKSON, D. Time course of angiogenesis and lymphangiogenesis after brief corneal inflammation. **Cornea**, v. 25, n. 4, p. 443-447, 2006.

DE VRIES, C. et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, v. 255, n. 5047, p. 989-991, 1992.

DEUTSCH, T. A.; HUGHES, F. Supressive effects of indomethacin on thermally

induced neovascularization of rabbit corneas. **Am J Ophthalmol**, v.87, n.4, p.536-540, 1979.

DOUGHTY, M. J.; GLAVIN, S. Efficacy of different dry eye treatments with artificial tears or ocular lubricants: a systematic review. **Ophthalmic Physiol Opt**, v. 29, n. 6, p. 573-583, 2009.

FERNALD, R. D. Evolution of eyes. **Curr Opin Neurobiol**, v. 10, n. 4, p. 444-450, 2000.

FERRARI, G. et al. Nerves and neovessels inhibit each other in the cornea. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 1, p. 813-820, 2013a.

FERRARI, G. et al. Safety and Efficacy of Topical Infliximab in a Mouse Model of Ocular Surface Scarring. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 54, n. 3, p. 1680-1688, 2013b.

FERRARI, G. et al. Ocular surface injury induces inflammation in the brain: in vivo and ex vivo evidence of a corneal-trigeminal axis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 55, n. 10, p. 6289-6300, 2014.

FONG, G. H. et al. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. **Development**, v. 126, n. 13, p. 3015-3025, 1999.

FORSYTHE, J. A. et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 9, p. 4604-4613, 1996.

GABISON, E. et al. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. **Exp Eye Res**, v. 78, n. 3, p. 579-589, 2004.

HASSELL, J.; BIRK, D. The molecular basis of corneal transparency. **Exp Eye Res**, v. 91, n. 3, p. 326-335, 2010.

IRIYAMA, A. et al. Gene transfer using micellar nanovectors inhibits corneal neovascularization in vivo. **Cornea**, v. 30, n. 12, p. 1423-1427, 2011.

KAGAMI, H.; O'CONNELL, B. C.; BAUM, B. J. Evidence for the systemic delivery of a transgene product from salivary glands. **Hum Gene Ther**, v. 7, n. 17, p. 2177-2184, 1996.

KENDALL, R. L.; THOMAS, K. A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 22, p. 10705-10709, 1993.

KLICHE, S.; WALTENBERGER, J. VEGF receptor signaling and endothelial function. **IUBMB Life**, v. 52, n. 1-2, p. 61-66, 2001.

KOENIG, Y. et al. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin®) eye drops against corneal neovascularization. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 247, n. 10, p. 1375-1382, 2009.

LAI, C. M. et al. Inhibition of angiogenesis by adenovirus-mediated sFlt-1 expression in a rat model of corneal neovascularization. **Hum Gene Ther**, v. 12, n. 10, p. 1299-1310, 2001.

LIU, G. S. et al. Gene delivery by subconjunctival injection of adenovirus in rats: a study of local distribution, transgene duration and safety. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. e0143956, 2015.

LIU, Q.; MURUVE, D. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. **Gene Ther**, v. 10, n. 11, p. 935-940, 2003.

LOHELA, M. et al. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. **Curr Opin Cell Biol**, v. 21, n. 2, p. 154-165, 2009.

LUO, L. et al. Photoreceptor avascular privilege is shielded by soluble VEGF receptor-1. **Elife**, v. 2, p. e00324, 2013.

MADDULA, S. et al. Horizons in therapy for corneal angiogenesis. **Ophthalmology**, v. 118, n. 3, p. 591-599, 2011.

MAHASRESHTI, P. J. et al. Intravenous delivery of adenovirus-mediated soluble FLT-1 Results in liver toxicity intravenous delivery of adenovirus-mediated soluble FLT-1 results in liver toxicity. **Clin Cancer Res**. v. 9 n. 7, p. 2701-2710, 2003.

MIN, Z. et al. Lentivirus-mediated sFlt-1 gene fragment transfer suppresses retinal neovascularization. **Curr Eye Res.**, v. 34, n. 5, p. 401-410, 2009.

MIRABELLI, P. et al. Early effects of dexamethasone and anti-VEGF therapy in an inflammatory corneal neovascularization model. **Exp Eye Res.**, v. 125C, p. 118-127, 2014.

NGUYEN, C. Q. et al. IL17: potential therapeutic target in Sjögren's syndrome using adenovirus-mediated gene transfer. **Lab Invest.**, v. 91, n. 1, p. 54-62, 2011.

ORMEROD, L. D.; ABELSON, M. B.; KENYON, K. R. Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter discs. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 30, n. 10, p. 2148-2153, 1989.

PHILIPP, W.; SPEICHER, L.; HUMPEL, C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 41, n. 9, p. 2514-2522, 2000.

QAZI, Y. et al. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. **Brain Res Bull**, v. 81, n. 2-3, p. 198-210, 2010.

ROCHA, E. M. et al. The aging lacrimal gland: changes in structure and function. **Ocul Surf**, v. 6, n. 4, p. 162-174, 2008.

ROCHA, E. M. et al. Transduction, tropism, and biodistribution of AAV vectors in the lacrimal gland. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 52, n. 13, p. 9567-9572, 2011.

ROCHA, E. M. et al. Recovery of radiation-induced dry eye and corneal damage by pretreatment with adenoviral vector-mediated transfer of erythropoietin to the salivary glands in mice. **Hum Gene Ther**, v. 24, n. 4, p. 417-423, 2013.

SAMUNI, Y.; BAUM, B. J. Gene delivery in salivary glands: from the bench to the clinic. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 11, p. 1515-1521, nov. 2011.

SHALABY, F. et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. **Nature**, v. 376, n. 6535, p. 62-66, 1995.

SHIBUYA, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. **J Biochem Mol Biol**, v. 39, n. 5, p. 469-478, 2006.

STEVENSON, W. et al. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: Ranibizumab (Lucentis) Vs bevacizumab (Avastin). **Ocul Surf**, v. 10, n. 2, p. 67-83, 2012.

TJWA, M. et al. VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. **Cell Tissue Res**, v. 314, n. 1, p. 5-14, 2003.

UEYAMA, K. et al. Ocular localization and transduction by adenoviral vectors are serotype-dependent and can be modified by inclusion of RGD fiber modifications. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e108071, 2014.

VEIKKOLA, T. et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. **The EMBO J**, v. 20, n. 6, p. 1223-1231, 2001.

VOUTETAKIS, A. et al. Reengineered salivary glands are stable endogenous bioreactors for systemic gene therapeutics. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 9, p. 3053-3058, 2004.

WANG, J. et al. Effect of serotype 5 adenoviral and serotype 2 adeno- associated viral vector-mediated gene transfer to salivary glands on the composition of saliva. **Hum Gene Ther**, v. 17, n. 4, p. 455-463, 2006.

YANG, Y. et al. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 10, p. 4407-4411, 1994.

ZHU, Z. et al. Tumor necrosis factor inhibitor gene expression suppresses lacrimal gland immunopathology in a rabbit model of autoimmune dacryoadenitis. **Cornea**, v. 22, n. 4, p. 343-451, 2003.

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 040/2013, sobre o projeto intitulado “*Avaliação da transferência gênica por vetor viral na glândula lacrimal e resposta na neovascularização corneana.*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Eduardo Melani Rocha** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de maio de 2013.

We certify that the protocol nº 040/2013, entitled “*Evaluation of gene transfer by viral vector in the lacrimal gland and influence on corneal neovascularization*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 05/27/2013.

Ribeirão Preto, 27 de maio de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP