Romy Schmidt Brock Zacharias

Efeitos biomoleculares do JB-1 (um peptídeo análogo do IGF-1) em um modelo experimental de retinopatia induzida por oxigênio em ratos.

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

Programa de Pediatria

Orientador: Dr. Mário Cícero Falção

São Paulo 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Zacharias, Romy Schmidt Brock

Efeitos biomoleculares do JB-1 (um peptídeo análogo do IGF-1) em um modelo experimental de retinopatia induzida por oxigênio em ratos / Romy Schmidt Brock Zacharias. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.

Orientador: Mário Cícero Falcão.

Descritores: 1.Retinopatia da prematuridade 2.Fator de crescimento insulin-like I 3.Ratos Sprague-Dawley 4.Recém-nascido 5.Oxigênio 6.Hiperóxia

USP/FM/DBD-286/11

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha família,

Meu marido **Leandro**, que sempre ao meu lado, celebrou as alegrías, ofereceu suporte aos desafíos e vivenciou todos os momentos para que esta conquista se realizasse,

Meus filhos **Bíanca e Vínicius**, as luzes da minha vida.

Agradeço a

Kay Beharry

por todos os ensinamentos,
os quais levarei por toda a vida,
além do apoio e amizade
que foram essenciais
durante esta jornada.

Agradeço a

Dr. Houchang D. Modanlou,

pela oportunidade oferecida
e pela confiança dispensada
desde o inicio
e que tornou
realidade o sonho deste projeto.

Agradeço a mínha amiga,

Bisrat Gebrekristos,

pela amizade e força nos momentos dificeis.

Agradeço aos outros fellows da UCI,

Jamal Hasan,
Katherine Kunioshi,
Rebecca Colemann,
Piyush Patel and
Charles

pela amizade e apoio e pelos bons momentos vivenciados juntos.

Agradeço a todos da **equípe do laboratório da UCI**

> pela ajuda e amizade indispensáveis para a realização deste trabalho

Agradeço aos meus país,

Roger e Emmy,

pelo incentivo, apoio e dedicação sempre prestados.

Ao meu orientador,

Mario Cicero Falcão,

pelo apoio e incentivo na realização do trabalho.

- Aos meus írmãos, Roger e Ryane, por compartilharem em conjunto toda a minha historia.
- A minha Tia **Rejane Brock** e a minha nona Ermide, pela ajuda que prestaram e prestam diariamente.
- A **Dra Vera Lúcia Jornada Krebs** pelo incentivo e atenção dedicados.
- A **Dra Alice D'Agostíní Deutsch**, pelo suporte, compreensão e amízade.
- A Dra Valdenise Martins Laurindo Tuma Kalil, pelo apoio de sempre.
- A equipe do Berçário Anexo a Maternidade do HCFMUSP, pela força e companheirismo no día a día desta jornada.
- A equipe do Berçário do Hospital Israelita Albert Einstein, por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas nestes anos.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de tabelas e gráficos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	02
1.1. Retinopatia da prematuridade	02
1.2. Histórico	02
1.3. Incidência	04
1.4. Fisiopatologia da retinopatia da prematuridade	05
1.5. O papel do VEGF na retinopatia da prematuridade	07
1.6. O papel do IGF na retinopatia da prematuridade	10
1.7. Estudos preliminares	12
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Desenho do estudo	24
3.2. Ciclos Hiperóxia/Hipóxia	27
3.3. A droga	29
3.4. Justificativa das doses	30
3.5. Tamanho da amostra	31
3.6. Coleta das amostras	32
3.7. Determinação de VEGF,sVEGFR-1 e IGFs	33
3.8. Perfusão com fluoresceína-dextran	34

3.9. Coloração das retinas pelo método de ADPase	35
3.10. Extração de DNA	36
3.11. PCR em tempo real	37
3.12. Análise estatística	39
3.13. Cuidados emergênciais	40
3.14. Treinamento de pessoal	40
3.15. Método de eutanásia	41
3.16. Quantificação da neovascularização retiniana pela pontuação	
da retina (score)	42
4. RESULTADOS	45
4.1.Crescimento somático	45
4.2. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	46
4.3. Fator de crescimento Insulin-like I (IGF-1)	47
4.4. sVEGFR-1	48
4.5. Fator de crescimento Insulin-like II (IGF-2)	49
4.6. Quantificação da neovascularização retiniana	49
4.7. Expressão gênica dos fatores relacionados à angiogênese	50
5. DISCUSSÃO	73
5.1. Justificativa do modelo experimental em ratos	73
5.2. Protocolo de oxigenioterapia para indução de retinopatia	75
5.3. Efeitos do tratamento na avaliação antropométrica	77
5.4. Influência do tratamento nos fatores de crescimento	78
5.5. Genes relacionados à angiogênese	82
6. CONCLUSÃO	86
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ROP retinopatia da prematuridade

RN recém-nascido

IG idade gestacional

RIO retinopatia induzida por oxigênio

VEGF fator de crescimento endotelial vascular

IGF fator de crescimento insulin-like

GH hormônio do crescimento

VEGFR-1 receptor tipo 1 do fator de crescimento endotelial vascular

sVEGFR-1 receptor tipo1 solúvel do fator de crescimento endotelial vascular

P14 14 dias pós-natais

P21 21 dias pós-natais

ELISA Ensaio Imunoabsorvente ligado a Enzima

PCR Reação em cadeia da polimerase

DO₂ Dias em Oxigênio

AA Ar ambiente

H/H Hiperóxia/Hipóxia

n Tamanho das amostras

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1- Efeitos dos diferentes tratamentos nos niveis séricos	
dos fatores de crescimento	53
Tabela 2 - Expressão gênica dos fatores de crescimento	
angiogênicos na retina dos ratos no 14o. dia de vida	54
Tabela 3 - Expressão gênica dos fatores de crescimento	
angiogênicos na retina dos ratos no 21o. dia de vida	55
Tabela 4 - Expressão gênica dos reguladores positivos da	
angiogênese na retina dos ratos no 14o. dia de vida	56
Tabela 5 - Expressão gênica dos reguladores positivos da	
angiogênese na retina dos ratos no 21o. dia de vida	57
Tabela 6 - Expressão gênica dos reguladores negativos da	
angiogênese na retina dos ratos no 14o. dia de vida	58
Tabela 7 - Expressão gênica dos reguladores negativos da	
angiogênese na retina dos ratos no 21o, dia de vida	59

Gráfico 1- Efeito do ciclo de oxigênio no peso dos ratos em	
gramas aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	60
Gráfico 2- Efeito do ciclo de oxigênio no comprimento dos ratos em	
centímetros aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	60
Gráfico 3- Efeito do ciclo de oxigênio no peso dos ratos em	
gramas aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	61
Gráfico 4- Efeito do ciclo de oxigênio no comprimento dos ratos em	
centímetros aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	61
Gráfico 5- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de VEGF na retina	
dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	62
Gráfico 6- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de VEGF no fluído vítreo	
dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	62
Gráfico 7- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de VEGF na retina	
dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	63
Gráfico 8- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de VEGF no fluído vítreo	
dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	63
Gráfico 9- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de IGF-1 na retina	
dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	64
Gráfico 10- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de IGF-1 no fluído vítreo	
dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	64

Gráfico 11- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de IGF-1 na retina	
dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	65
Gráfico 12- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de IGF-1 no fluído vítreo	
dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	65
Gráfico 13- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de sVEGFR-1 na retina	
dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	66
Gráfico 14- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de sVEGFR-1 no vitreo	
dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	66
Gráfico 15- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de sVEGFR-1 na retina	
dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	67
Gráfico 16- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de sVEGFR-1 no vítreo	
dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento	67

Resumo

RESUMO

EFEITOS BIOMOLECULARES DO JB-1 (UM PEPTÍDEO ANÁLOGO DO IGF1) EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE RETINOPATIA INDUZIDA POR
OXIGÊNIO EM RATOS. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de
São Paulo, 2011.

INTRODUÇÃO: Baixos níveis séricos de fator de crescimento insulin-like I (IGF-1) ao nascimento têm sido considerados um fator de risco para o desenvolvimento da retinopatia da prematuridade em recém-nascidos prematuros de extremo baixo peso. Isto se deve ao seu papel como fator permissivo para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) exercer sua função no desenvolvimento normal e patológico dos vasos da retina.

OBJETIVO: Testar a hipótese de que a administração do JB-1 (um análogo do IGF-1 que inibe de forma potente a auto-fosforilação do receptor do IGF-1 pelo IGF-1) durante a hiperóxia previne a retinopatia induzida por oxigênio em nosso modelo experimental em ratos.

MATERIAL E METODOS: Ratos recém-nascidos foram expostos a 50% de oxigênio com três episódios consecutivos de hipóxia (12% de oxigênio) do nascimento ao 14° dia de vida. Os ratos foram tratados com injeções subcutâneas de 1) JB-1 (1μg/d) nos três primeiros dias de vida (JB-1 x3); 2) JB-1(1μg/d) por dias alternados do 1° ao 13° dias de vida (JB-1x7) 3) ou volume equivalente de solução salina. Grupos controles foram criados em ar ambiente nas mesmas condições, exceto pelo ciclo de hiperóxia/ hipóxia. Os grupos foram analisados após a exposição ao oxigênio no 14° dia de vida ou deixados em ar ambiente por mais sete dias até o sacrifício, no 21° dia de vida. Determinou-se as dosagens sistêmicas e oculares de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor tipo1 solúvel do fator de crescimento endotelial vascular (sVEGFR-1) e fator de crescimento insulin-like I (IGF-1), associados a análise da vascularização retiniana e do perfil dos genes relacionados à angiogênese retiniana.

RESULTADOS: O tratamento com JB-1x3 resultou em supressão efetiva da retinopatia induzida por oxigênio, sem efeitos adversos no crescimento somático e foi associado a um aumento do sVEGFR-1 quando comparado com o JB-1x7. Ao contrário, o tratamento com JB-1x7 durante a exposição ao oxigênio levou à diminuição do peso corpóreo e níveis mais altos de IGF-1 e VEGF relacionados à presença de tortuosidades vasculares e neovascularização retiniana, quando comparado com as retinas que receberam apenas solução salina.

CONCLUSÃO: O tratamento curto e sistêmico com JB-1 durante a hiperóxia resultou em prevenção da retinopatia induzida por oxigênio sem restrição do

crescimento somático. Novos estudos devem ser realizados para determinar se o JB-1 pode ser usado em recém-nascidos de extremo baixo peso na prevenção da retinopatia da prematuridade.

Descritores: 1. RETINOPATIA DA PREMATURIDADE 2.FATOR DE CRESCIMENTO INSULIN-LIKE I 3. RATOS SPRAGUE-DAWLEY 4.RECÉMNASCIDO 5.OXIGÊNIO 6. HIPERÓXIA

Summary

Summary

BIOMOLECULAR EFFECTS OF JB-1 (AN IGF-1 PEPTIDE ANALOG) IN A RAT MODEL OF OXYGEN-INDUCED RETINOPATHY

INTRODUCTION: Low serum insulin growth factor (IGF-1) levels at birth is a risk factor for the development of retinopathy of prematurity in extremely low birth weight infants. This may be due to its role as a permissive factor for vascular endothelial growth factor (VEGF) function in normal and pathologic vascular development.

OBJECTIVE: To test the hypothesis that JB-1 (an IGF-1 analog that potently inhibits the autophosphorylation of the IGF-1 receptor by IGF-1) administration during hyperoxia prevents oxygen induced retinopathy in our rat model.

MATERIAL AND METHODS: Neonatal rats were exposed to 50% oxygen with brief, clustered, hypoxic (12% oxygen) episodes from birth to day 14. The pups were treated with subcutaneus injections of 1) JB-1 (1μg/d) on the first, second, and third day (JB-1x3) 2) JB1 (1μg/d) on alternate days from first to day 13 (JB-1x7); or equivalent volume of saline. Control littermates were raised in room air with all conditions identical except for inspired oxygen. Groups were analyzed after hyperoxia/hypoxia cycling on day 14 or allowed to recover in room air until the 21st day. Systemic and ocular VEGF, soluble VEGFR-1, and IGF-1; retinal vasculature and gene profile of retinal angiogenesis were assessed.

RESULTS: JB-1x3 treatment resulted in successful suppression of oxygen-induced retinopathy with no adverse effect on anthropometric growth, which was associated with increased sVEGFR-1 compared to JB-1x7. In contrast, intermittent and long exposure to JB-1 (JB-1x7) during the hyperoxia/hypoxia cycling period resulted in decreased body weight and higher ocular IGF-1 and VEGF levels as well as vascular tortuosity and retinal neovascularization compared with saline treated retinas.

CONCLUSION: Systemic treatment with JB-1 during hyperoxia results in successful prevention of oxygen-induced retinopathy with little adverse effects on anthropometric growth. Further confirmatory studies are needed to determine whether systemic JB-1 should be used in extremely low birth weight infants to prevent retinopathy of prematurity.

Key Words: 1.RETINOPATHY OF PREMATURITY 2. INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 3. RATS, SPRAGUE-DAWLEY 4. INFANT, NEWBORN 5. OXYGEN 6. HYPEROXIA

ċ

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Retinopatia da prematuridade

A retinopatia da prematuridade (ROP) é uma doença ocular vascular caracterizada pelo crescimento anormal de vasos sanguíneos na retina incompletamente vascularizada de recém-nascidos (RN) prematuros. A ROP pode apresentar-se de forma leve e com resolução espontânea, ou evoluir para fibrose e descolamento de retina. Ela acomete principalmente os recémnascidos prematuros e de muitíssimo baixo peso (menor que 1000g)¹⁻⁵ e constitui uma importante causa de cegueira em crianças em países desenvolvidos.

1.2 Histórico

A Retinopatia da prematuridade foi inicialmente descrita por Terry⁶ em 1942 e denominada de fibroplasia retrolental devido aos achados observados no exame oftalmológico caracterizado por uma membrana acinzentada e vascularizada formada atrás do cristalino.

Em 1949, Owens e Owens⁷ descreveram a evolução das alterações relacionadas à doença: inicialmente caracterizada por veias retinianas dilatadas e artérias tortuosas, seguida de edema e infiltração retiniana, resultando em

descolamento de retina e perda da função visual, em uma fase mais avançada⁸.

Após quase uma década de intensos estudos e a busca para explicar a nova patologia que acometia os olhos de recém-nascidos prematuros, em 1951, o termo retinopatia da prematuridade passou a ser utilizado, e neste mesmo ano descreveu-se a associação da retinopatia ao uso de oxigênio⁹⁻¹⁰. Esta descoberta resultou no estabelecimento de a uma política de restrição ao uso de oxigênio nas unidades neonatais, levando a uma diminuição importante da incidência da doença de 50 % para 4%.¹¹

No entanto, com a melhora da sobrevida dos RNs mais prematuros e de muito baixo peso nas décadas de 70 e 80, devido ao surgimento de novas técnicas de ventilação mecânica e do surfactante para uso endotraqueal, observou-se um novo aumento das taxas de retinopatia da prematuridade, caracterizando o segundo período epidêmico da doença.¹²

Com o passar dos anos, apesar da incidência de ROP ter diminuído de 65,8% na década de 80 para cerca de 57% na década de 90, ela ainda permanece alta em recém-nascidos de muitíssimo baixo peso que sobrevivem, e em alguns centros ainda representa cerca de 84% quando se consideram RN menores que 28 semanas de idade gestacional ^{13,14,15}.

1.3 Incidência

Os avanços na terapêutica neonatal permitiram a sobrevivência de RN cada vez menores e mais prematuros. Estes RN apresentam maior risco de evoluírem com retinopatia da prematuridade.

Nos Estados Unidos (EUA), a incidência de recém-nascidos de muitíssimo baixo peso é de 1,2% dos nascimentos, mas corresponde a 46% das mortes neonatais¹⁶. A incidência de casos graves de retinopatia da prematuridade é inversamente proporcional à idade gestacional (IG) e varia de 50% em RN com 23 semanas, de 13 a 23% com 24 semanas e de 9 a 17% com 25 semanas de IG¹⁷. Nos EUA, em 2007, a incidência de retinopatia foi de cerca de 50% dos RN com peso abaixo de 1250 gramas, incluindo todos os RN que apresentaram qualquer grau da doença. Os casos mais leves regridem sem deixar seqüelas e correspondem a 90% da totalidade. No entanto, a retinopatia em fase mais avançada pode levar a problemas visuais e até cegueira; e os números de crianças afetadas não são baixos: cerca de 1100 a 1500 RNs desenvolvem retinopatia que necessita de tratamento médico e destes 400 a 600 crianças passam a ser consideradas como legalmente cegas por retinopatia a cada ano.¹⁸

No Brasil, a incidência de retinopatia apresenta uma ampla variação entre os diversos serviços, situando-se em torno de 25 a 29% em Porto Alegre¹⁹ e São Paulo^{20,21}, e chegando até a taxa de 63% em um serviço de neonatologia na cidade de Natal (RN)²², considerando-se RNs com peso de nascimento menor de 1500 gramas.

Infelizmente, os dados de retinopatia da prematuridade no Brasil ainda estão em grande parte subestimados e não existe uma estatística nacional unificada que inclua todos os RNs de risco.

Surpreendentemente, um estudo recente incluindo mais de 30 unidades neonatais na cidade de São Paulo (maior cidade brasileira) demonstrou que apesar de todas as unidades estarem cientes dos fatores de risco e importância da retinopatia da prematuridade, apenas 86% destas unidades realizavam o exame para a sua detecção como rotina e infelizmente apenas 61% conheciam o período exato para a realização do primeiro exame oftalmológico para diagnóstico da retinopatia da prematuridade.²³

1.4. Fisiopatologia da retinopatia da prematuridade

A formação de vasos sanguíneos, em geral, ocorre através de dois mecanismos: a vasculogênese e a angiogênese. Na vasculogênese os vasos são formados a partir de células precursoras vasculares que se diferenciam e se

agregam para formar tubos endoteliais primitivos e na angiogênese os vasos são formados pelo desenvolvimento e ramificação de vasos já formados. A formação da vascularização da retina humana envolve ambos os processos.

O desenvolvimento normal dos vasos da retina inicia-se intra-útero, ao redor da 14ª semana de gestação, pela migração de um grande número de células precursoras vasculares do nervo óptico em direção à periferia. Estas células se diferenciam e proliferam, formando uma rede vascular discreta ao redor da 17-18ª semanas de gestação, que vai se tornando mais evidente ao redor da 21ª semana.²⁴

Na 27ª semana de gestação, a vascularização retiniana encontra-se apena 70% completa e é durante as últimas semanas que esta vascularização se desenvolve mais rapidamente, completando-se ao redor da 40ª semana de gestação.²⁵

No ambiente intra-uterino, a pressão parcial de oxigênio é em torno de 30 mmHg. Esta hipóxia fisiológica estimula efetivamente a produção de fatores de crescimento que levam ao desenvolvimento vascular retiniano normal. Com o nascimento prematuro, estes RN passam a ser submetidos a pressão parcial arterial de oxigênio (PaO₂) de 60 -100mmHg, o que reduz o estímulo para a produção de fatores de crescimento e prejudica a angiogênese em uma retina ainda em formação.²⁶

O desenvolvimento da retinopatia a prematuridade ocorre em dois estágios:

- (1) vaso-obliteração: ocorre quando o RN prematuro é exposto a altos teores de oxigênio e o desenvolvimento normal dos vasos da retina é prejudicado, causando vaso-constrição na retina imatura e obliteração dos capilares, levando a isquemia, retardo de desenvolvimento dos vasos e apoptose das células da retina; ²⁷
- (2) vaso-proliferativa: esta fase é iniciada quando os RN retornam para o ar ambiente. Neste ponto, a retina não vascularizada se torna metabolicamente ativa e progressivamente hipóxica. A menor tensão de oxigênio e a hipóxia induzida pela isquemia promove uma proliferação anormal de vasos retinianos, caracterizada por um excesso de neovasos e extravazamento sanguíneo. Nesta segunda fase, ocorrem hemorragias retinianas e em casos graves, descolamento de retina.²⁸

1.5. O papel do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) na retinopatia da prematuridade

Durante o desenvolvimento normal da retina, os vasos sanguíneos crescem do nervo óptico em direção à periferia da retina. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é necessário para este desenvolvimento.²⁹ À medida que a retina se desenvolve, ocorre um aumento da demanda de oxigênio pelo tecido neural em formação, criando uma relativa hipóxia localizada e o VEGF é

produzido em resposta a esta hipóxia. Os vasos sanguíneos crescem, então, em direção ao estímulo promovido pelo VEGF. Quando a oferta de oxigênio aumenta devido aos novos vasos formados, ocorre a supressão da expressão do VEGF e assim cessa o estímulo ao desenvolvimento e proliferação dos vasos. ³⁰

Na retinopatia da prematuridade, as condições hiperóxicas causam uma diminuição na produção de VEGF e regressão dos vasos, resultando em uma angiogênese retiniana prejudicada desde o início. ³⁰ À medida que a oferta de oxigênio diminui, quando os RN são colocados em ar ambiente, as células retinianas repentinamente experimentam a hipoxemia e começam a produzir grande quantidade de VEGF. Esta produção aumentada resulta em uma proliferação vascular descontrolada.

O importante papel do VEGF no desenvolvimento da ROP foi demonstrado tanto em animais ³¹⁻³⁵ quanto em RN prematuros ³⁶⁻³⁷ e comprovado pelo fato de que os níveis de VEGF no humor vítreo apresentam uma correlação positiva com o grau de neovascularização observada. Aiello e colaboradores ³⁷ demonstraram um aumento proporcional dos níveis da proteína do VEGF no humor aquoso e vítreo em retinopatias neovasculares em humanos em relação à gravidade da doença. Pierce e colaboradores³⁸ mostraram que o aumento da produção de VEGF na retinopatia induzida por oxigênio em ratos

pode ser estimulada pela hipóxia tecidual e de modo oposto pode ser revertida se os animais forem colocados de volta no oxigênio.

Portanto, o VEGF age como um forte (e possivelmente o principal) estímulo angiogênico da neovascularização retiniana nas lesões por oxigênio.

Apesar do VEGF ter um importante papel no desenvolvimento dos vasos sanguíneos da retina, estudos demonstratram que a inibição do VEGF não controla totalmente a neo-vascularização induzida pela hipóxia na retinopatia da prematuridade, sugerindo que outros fatores de crescimento devem estar envolvidos na fisiopatologia da doença.

Além disso, o uso controlado do oxigênio suplementar não diminuiu a incidência da retinopatia conforme esperado (STOP-ROP) ¹⁴, reforçando a idéia de que a fisiopatologia da ROP seja multifatorial.

Atentando-se ao fato de que a prematuridade por si só é o principal fator de risco para o desenvolvimento da ROP sugere-se que fatores relacionados ao crescimento e desenvolvimento sejam ser críticos; e assim o hormônio de crescimento (GH) ³⁹ e o fator de crescimento insulin-like-1 e -2 (IGF) passaram a ser investigados como mediadores relacionados ao processo.

1.6. O papel do Fator de Crescimento Insulin-like (IGF) na retinopatia da prematuridade

O fator de crescimento insulin-like é um peptídeo que promove crescimento pós-natal, agindo como um fator intermediário da ação do hormônio de crescimento (GH) 40 .

Há várias décadas, reportou-se que a ablação pituitária levava à remissão da retinopatia diabética e esta remissão estava associada à redução dos níveis séricos de hormônio de crescimento, sugerindo uma relação direta entre o eixo GH/IGF e neovascularização retiniana^{41,42}. No entanto, o real papel do GH nesta neovascularição retiniana ainda permanece controverso e, portanto, recentemente, mais atenção tem sido dada a outros fatores de crescimento como IGF-1 e IGF-2. Estudos em culturas de células mostraram que o IGF-1 influencia o crescimento de células endoteliais⁴³ e estudos em animais forneceram outras evidências de que o IGF influencia a angiogênese e exerce papel crítico no desenvolvimento da vascularização retiniana, através da interação com outros fatores de crescimento como o VEGF 44.

O importante papel que o IGF-1 exece na angiogênese retiniana justifica o interesse crescente sobre os mecanismos pelo qual o IGF-1 exerce sua ação nas doenças retinianas, tais como retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade e retinopatia da prematuridade. Estudos experimentais em

animais demonstraram que a retinopatia proliferativa é substancialmente reduzida em camundongos tratados com um antagonista do receptor de hormônio do crescimento⁴⁴ e que o IGF-1 também é necessário para o desenvolvimento normal da vascularização da retina. A ausência de IGF-1 (em camundongos geneticamente modificados) no período neonatal precoce está associada a um crescimento vascular alterado e retinopatia proliferativa⁴³. Consequentemente, a falta de IGF-1 não inibe o crescimento vascular através da supressão do VEGF, mas age como um fator permissivo para que o VEGF possa exercer sua função no desenvolvimento vascular⁴⁵.

Desta forma, postula-se que, intra-útero o VEGF é encontrado na frente de crescimento do vaso e que a quantidade de IGF-1 circulante deve ser suficiente para permitir este crescimento. Quando o RN nasce prematuramente, os níveis de IGF-1 não são mantidos nos mesmos níveis intra-uterinos e com isso o crescimento vascular é interrompido, apesar da presença do VEGF. Ao mesmo tempo, a exposição destes recém-nascidos a altas concentrações de oxigênio suprime também a produção de VEGF, contribuindo juntamente com esta inibição do crescimento vascular. À medida que o RNPT amadurece, a área da retina avascular em desenvolvimento se torna hipóxica, e os níveis de VEGF aumentam na retina e no vítreo. Concomitantemente com este amadurecimento os níveis de IGF-1 também aumentam. Quando os níveis de IGF-1 atingem um determinado valor ele permite a ação do VEGF, que está acumulado no vítreo e

assim começa a haver proliferação vascular ^{44,45}. Estes achados sugerem que o IGF-1 é essencial na primeira fase da retinopatia⁴⁴ e a extensão da segunda fase depende da extensão da primeira. Portanto, se os níveis de IGF-1 são suficientes após o nascimento, o desenvolvimento vascular ocorre normalmente e a retinopatia não de desenvolve.

Baseando-se nestes dados, sugerimos que a possibilidade de controlar e modular os efeitos do IGF-1 durante as diferentes fases do desenvolvimento vascular da retina pode exercer um impacto positivo na abordagem terapêutica da retinopatia da prematuridade.

1.7. Estudos preliminares

O estudo apresentado faz parte de uma linha de pesquisa de retinopatia induzida por oxigênio desenvolvida em um modelo experimental em ratos, que partindo de experimentos que mostraram o desenvolvimento normal da retina do rato e sua relação com os fatores de crescimento, chegou-se a constatação de que o IGF-1 exerce papel fundamental neste desenvolvimento e que uma possibilidade de controlar a doença possa ser através da inibição do IGF-1.

Inicialmente estudou-se o desenvolvimento normal da retina do rato, desde o seu nascimento até o 21° dia de vida correlacionando os níveis de VEGF, IGF-1, GH e VEGFR-1 na retina e vítreo com as suas diversas fases, a

fim de se determinar o padrão normal do comportamento da retina do rato. Neste estudo⁴⁶, observou-se ao nascimento, que a retina do rato mostra vários vasos primordiais que migram do nervo óptico em direção à periferia (Figura 1) e partir deste momento, uma trama vascular mais fina de capilares inicia seu crescimento, surgindo do nervo óptico, por trás dos vasos primordiais (Figura 2). À medida que a retina vai amadurecendo, a rede de capilares avança e se prolifera para a periferia e os vasos primordiais começam a regredir e desaparecer (Figuras 3 e 4), observando-se uma retina completamente desenvolvida após o 14º. dia de vida do rato (Figuras 5 e 6).

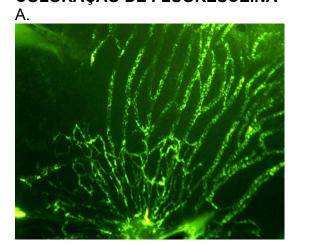
Relacionando-se este desenvolvimento retiniano com os fatores de crescimento, observa-se que os níveis de VEGF se mostraram constantes do nascimento até o 14º dia de vida, apresentaram um pico no 17º dia e voltaram a cair progressivamente até o 21º dia, confirmando o importante papel que o VEGF exerce na maturação retiniana.

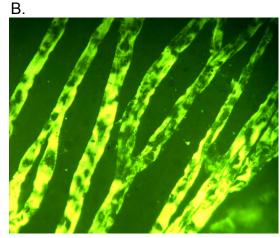
Os níveis de IGF-1 se mostraram altos ao nascimento, com diminuição até o 5° dia e novo pico no 10° dia. Após o nascimento, a queda dos níveis de IGF-1 é justificada pela perda das principais fontes de IGF-1 da placenta e do líquido amniótico. Após esta fase inicial, os níveis de IGF-1 aumentam lentamente permitindo o desenvolvimento normal dos vasos da retina e seu amadurecimento. O comportamento dos fatores de crescimento no desenvolvimento normal da retina confirma a teoria de que ambos VEGF e IGF-

1 são importantes e necessários para este desenvolvimento e que qualquer alteração desta função pode resultar em retinopatia.

Este estudo serviu de modelo e linha de base de comparação do desenvolvimento normal da retina para novos estudos futuros.

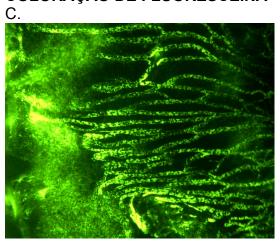
Figura 1- FOTOS DA RETINA DO RATO AO NASCIMENTO SOB COLORAÇÃO DE FLUORESCEÍNA

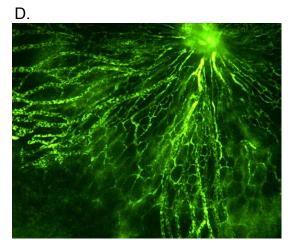




A. Observa-se partindo-se do nervo óptico a formação vascular rumo a periferia (magnificação de 4x) B. Observa-se os vasos primitivos em formação e a presença de células primordiais na parede dos vasos (magnificação de 10x)

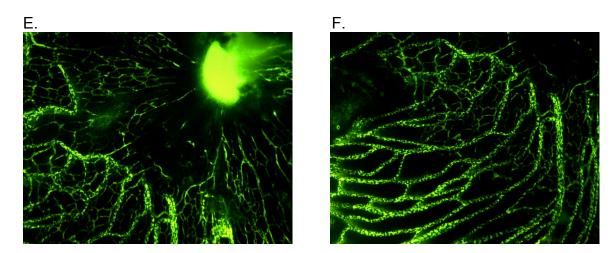
Figura 2 – FOTOS DA RETINA DO RATO NO 3º DIA DE VIDA SOB COLORAÇÃO DE FLUORESCEÍNA





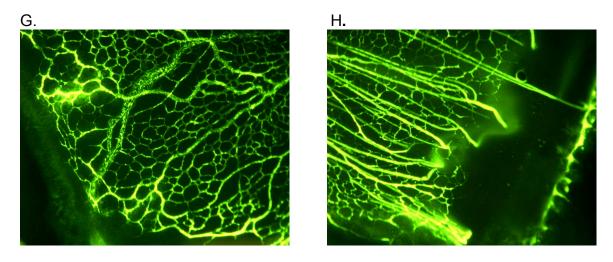
C. Observa-se a formação vascular em direção a periferia ainda composta de vasos primitivos com células primordiais (magnificação de 4x) D. Observa-se a região do nervo óptico com os vasos primitivos e uma rede de capilares mais finos começando a surgir (magnificação de 4x)

Figura 3 - FOTOS DA RETINA DO RATO NO 5º DIA DE VIDA SOB COLORAÇÃO DE FLUORESCEÍNA



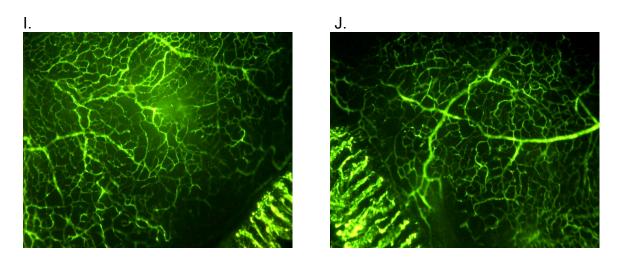
E. Observa-se partindo-se do nervo óptico a formação vascular fina se desenvolvendo rumo a periferia e o desaparecimento gradual dos vasos primordiais (magnificação de 4x) F. Observa-se os vasos primitivos em formação e a presença de células primordiais na parede dos vasos (magnificação de 10x)

Figura 4- FOTO DA RETINA DO RATO NO 7º DIA DE VIDA SOB COLORAÇÃO DE FLUORESCEÍNA



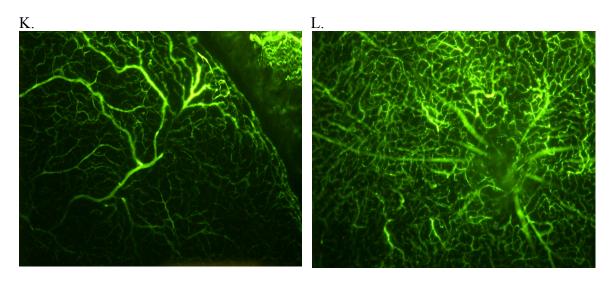
G e H. Observa-se a rede vascular mais fina atingindo a periferia, mas ainda com a preseça de vasos primordiais (magnificação de 4x)

Figura 5- FOTOS DA RETINA DO RATO NO 14º DIA DE VIDA SOB COLORAÇÃO DE FLUORESCEÍNA



I e J. Observa-se a rede vascular atingindo a periferia, com os vasos principais e seus ramos formando uma rede vasular mais densa, que representa a retina madura (magnificação de 4x)

Figura 6- FOTOS DA RETINA DO RATO NO 21º DIA DE VIDA SOB COLORAÇÃO DE FLUORESCEÍNA



K. Foto da periferia da retina do rato, mostrando a vascularização já completamente desenvolvida (magnificação de 4x) L. Foto da região central da retina do rato com o nervo óptico e a vascularização completamente desenvolvida (magnificação de 4x).
L.

Em outro estudo⁴⁷, comparou-se os efeitos do uso pós-natal precoce de Indometacina e Ibuprofeno nos níveis de VEGF, receptores de VEGF, IGF-1 e hormônio do crescimento (GH) em um modelo experimental de retinopatia induzida por oxigênio em ratos. A Indometacina e o Ibuprofeno são inibidores não seletivos da COX e usadas para o tratamento de persistência do canal arterial nos RN prematuros. Ensaios clínicos demonstraram que o uso destas drogas pode interferir de maneira positiva na retinopatia da prematuridade. Para avaliar os efeitos destas drogas na retinopatia induzida por oxigênio em ratos utilizou-se três grupos, que receberam injeções intra-peritoniais de 1) Indometacina na dose de 0,2 mg/kg no D1 (1° dia) e 0,1 mg/kg no D2 (2° dia) e D3 (3° dia); 2) Ibuprofeno na dose de 10 mg/kg no D1 e 5mg/kg no D2 e D3 e 3) Solução salina no D1, D2 e D3. Todos os grupos foram submetidos ao protocolo de hiperóxia e hipóxia desenvolvido pelo laboratório⁴⁴ que consiste em 4 ciclos de 50% de oxigênio por 6 horas, com 3 ciclos consecutivos de 12% de oxigênio por 2 minutos cada, do nascimento até o 14º dia de vida. Após o 14º dia os ratos retornavam ao ar ambiente por mais 7 dias. Os ratos foram sacrificados e suas retinas coradas com fluoresceína-dextran para avaliação da vascularização. Analisou-se também, amostras de sangue, vítreo e retina para determinação dos fatores de crescimento nos três grupos estudados.

Na análise geral, a Indometacina aumentou os níveis de VEGF em todos os compartimentos oculares associado a um aumento da neovascularização

retiniana, tortuosidade de vasos, tufos vasculares e extravazamento vascular comparado com os grupos do Ibuprofeno e solução salina. Por outro lado, o Ibuprofeno suprimiu os níveis de IGF-1 na retina e vítreo comparado com Indometacina e solução salina, demonstrando um padrão similar de neovascularização em relação ao grupo controle, com menos extravasamento e tufos vasculares. Este achado surpreendente levantou a atenção para o papel do IGF-1 no desenvolvimento da retinopatia da prematuridade, sugerindo que a supressão do IGF-1 poderia apresentar um efeito protetor na neovascularização retiniana.

Baseando-se nestas premissas, nossa proposta é examinar se um antagonista da IGF-1 é tão efetivo na supressão da retinopatia em um modelo novo de retinopatia induzida por oxigênio em ratos, utilizando-se períodos curtos e repetidos de hipóxia seguidos de longos períodos de hiperóxia, modelo este, que mais se assemelha as flutuações de oxigênio observadas em RN prematuros internados em unidades de terapia intensiva. Além do mais, programamos administrar o antagonista de IGF-1 durante os ciclos de hipóxia e hiperóxia, pois tem sido demonstrado que o início do processo que culmina com a neovascularização da retina ocorre antes do período de recuperação em ar ambiente. Finalmente, iremos comparar dois períodos de tratamento, um tratamento mais curto e outro mais longo, procurando determinar se as

intervenções durante um curto período são tão efetivas quanto as administradas durante toda a fase de hiperóxia.

2. Objetivos

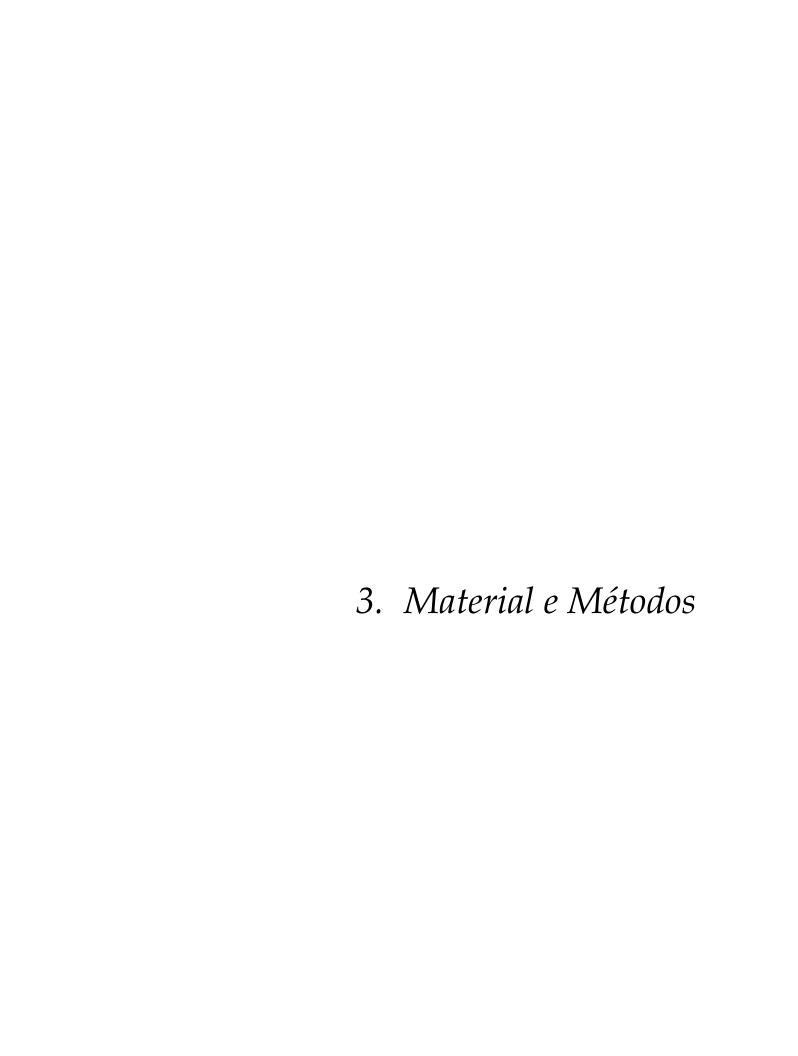
2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo geral.

Examinar os efeitos do uso de um análogo do IGF-1 (JB-1) em episódios curtos e sequenciais de hipóxia, durante o período de hiperóxia no IGF-1, IGF-2, VEGF e sVEGFR-1 no sangue, vítreo e retina durante o desenvolvimento da retinopatia induzida por oxigênio (RIO) em ratos aos 14 e 21 dias de vida.

2.2. Objetivos secundários.

- 1) Determinar se o uso de um análogo do IGF-1 é efetivo para o tratamento ou prevenção da retinopatia induzida por oxigênio, utilizando-se episódios repetidos e sequenciais de hipóxia durante o período de hiperóxia.
- 2) Determinar os efeitos da utilização curta (nos três primeiros dias de vida) e prolongada (por sete dias em dias alternados) de um análogo do IGF-1 no desenvolvimento da retinopatia em um modelo experimental de retinopatia induzida por oxigênio em ratos.



3. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental em um modelo animal de retinopatia induzida por oxigênio, utilizando-se ratos da raça *Sprague Dawley*.

Os experimentos com os animais foram realizados no laboratório de pesquisa do Departamento de Pediatria- área de Neonatologia da Universidade da Califórnia-Irvine. As análises laboratoriais, os testes de ELISA e o PCR em tempo real, assim como as dissecções das retinas foram todos realizados no mesmo local.

3.1.Desenho do estudo

Para testar a hipótese apresentada, utilizou-se ratas Sprague-Dawley grávidas, comprovadamente sem infecção e com a idade gestacional adequadamente determinada (18 dias), compradas do laboratório *Charles-River* (Wilmington, MD, USA). As ratas grávidas foram colocadas em ambiente apropriado, onde foram deixadas por 48 horas para estabilização após o transporte, e onde elas foram mantidas sem perturbações até o dia do parto. Estes animais foram colocados em local fresco e arejado, submetidos a ciclos de

12 horas dia /12 horas de noite com dieta e água em livre demanda. Dentro das primeiras 24 horas de vida, os recém-nascidos de diferentes mães, nascidos no mesmo dia, foram misturados e randomicamente divididos em novos grupos expandidos de 17 animais cada. Uma rata mãe foi mantida com o mesmo grupo de filhotes por todo o estudo. Ao nascimento, cada rato filhote foi pesado, seu comprimento foi medido (distância cabeça-nádegas) por um mesmo observador experiente e aleatoriamente colocado em um dos 4 grupos :

- 1) 50% de oxigênio com 3 episódios curtos e consecutivos de 12% de oxigénio com duração de 2 minutos a cada 6 horas, totalizando 12 ciclos por dia por 14 dias e então sacrificados. (14DO₂)
- 2) 50% de oxigênio com 3 episódios curtos e consecutivos de 12% de oxigênio com duração de 2 minutos a cada 6 horas, totalizando 12 ciclos por dia por 14 dias seguido de 7 dias em ar ambiente, sendo sacrificados aos 21 dias de vida. (14D-O₂/7D-AA).
- 3) 14 dias em ar ambiente
- 4) 21 dias em ar ambiente

Para cada grupo mencionado acima, os animais ainda foram subdivididos em 3 outros grupos dependendo do tratamento proposto :

- a) injeções subcutâneas de JB-1 na dose de $1\mu g/dia$ do 1° ao 3° dia de vida (3 doses).
- b) injeções subcutâneas de JB-1 na dose de $1\mu g$ /dia do 1º ao 13º dia de vida em dias alternados (7 doses).
- c) volume equivalente de solução fisiológica (solução salina) do 1º ao 3º dia de vida grupo controle

Todas as mães foram sacrificados com dose letal de pentobarbital sódico (150-200mg/kg) e os ciclos de hiperóxia e hipóxia foram realizados com os ratos colocados em uma câmara com controle de oxigênio (Oxyclycler- BioSpherix, Redfield,NY).

No momento do sacrificio, três ratos foram aleatoriamente escolhidos para a realização de perfusão cardíaca com fluoresceína para o posterior estudo da vascularização retiniana e três ratos foram separados para dissecção da retina e coloração desta pelo método de ADPase. Estes ratos foram inicialmente anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg). Dois ratos de cada grupo foram usados para a determinação da expressão do RNA mensageiro dos fatores angiogênicos e anti-angiogênicos por PCR em tempo real. Estes ratos foram sacrificados por decapitação sem anestesia, pois o uso de drogas anestésicas pode influenciar nos resultados. Nove ratos foram usados para a determinação de estudos imunoenzimáticos de VEGF, sVEGFR-1, IGF-1 e

IGF-2 no sangue, retina e vítreo. Estes ratos também foram sacrificados utilizando-se de técnica de decapitação sem anestesia.

FIGURA 7- Representação esquemática dos grupos do estudo

	Ar Ambiente		Hiperóxia/Hipóxia	
	14-dias	21-dias	14D-O ₂	14D-O ₂ /7D-AA
Solução Salina	17 ratos	17 ratos	17 ratos	17 ratos
JB1 x 3	17 ratos	17 ratos	17 ratos	17 ratos
JB1 x 7	17 ratos	17 ratos	17 ratos	17 ratos

3.2. Ciclos Hiperóxia/ Hipóxia

Após o nascimento, os ratos dos grupos de hiperóxia foram colocados em uma câmara de oxigênio (BioSpherix) conectadas a um aparelho que cicla o ar e controla a oferta de oxigênio denominado *oxycycler* (10"H x 22"W x 19"D, 25 kg). Cada câmara consegue abrigar duas caixas contendo os ratos. A quantidade de oxigênio dentro da câmara foi continuamente monitorada e

gravada em um computador Dell. O dióxido de carbono dentro da câmara foi igualmente monitorado pelo computador e removido da atmosfera utilizando-se uma mistura química de hidróxidos de sódio e cálcio. Esta câmara foi conectada a tanques de oxigênio e nitrogênio através de canos flexíveis. O *oxycycler* mede o oxigênio dentro da câmara e controla seus níveis através da infusão de nitrogênio para baixar a quantidade de O₂ ou da infusão de O₂ quando o objetivo é aumentar seus níveis dentro da câmara. Durante a estadia dentro da câmara, os ratos receberam dieta adequada e água em livre demanda. A luz ficou acesa por 12 horas e apagada por 12 horas e a temperatura ambiente foi mantida em cerca de 21°C.

O Computador ligado à câmara de oxigênio foi programado para ofertar 50% de oxigênio com 3 ciclos consecutivos de hipóxia a 12% de oxigênio por 2 minutos cada em períodos de 6 horas, durante todo o tempo em que os ratos estavam dentro da câmara de oxigênio, do nascimento até o 14º dia de vida conforme já mencionado. Este protocolo de hiperóxia e hipóxia foi previamente validado por Colemann e colaboradores ⁴⁸.

3.3. A droga

A droga JB-1 é um peptídeo sintético análogo do IGF-1 que foi criado a partir do modelo molecular do IGF-1, capaz de inibir proliferação celular.

O JB-1 foi o primeiro peptídeo sintetizado e representa uma alteração na região do domínio D, entre os resíduos 61-69.

Sequência nativa: 60 Met Ala Pro Leu Lis Pro Ala Lis Ser Ala 70

Sintética: Cis Tir Ala Ala Pro Leu Lis Pro Ala Lis Ser Cis (JB1)

Estes peptídeos sintéticos não são tóxicos, seus efeitos são reversíveis e eles são capazes de exercê-los mesmo em pequenas concentrações (nanogramas). O JB-1, especificamente, inibe a auto-fosforilação do IGF-1R (receptor do IGF-1) de forma concentração dependente ^{49,50}.

Em modelos experimentais, outro análogo do IGF-1, o JB-3 já foi utilizado com sucesso na inibição do IGF-1 ⁵¹.

3.4. Justificativa das doses

Como citado anteriormente, Smith e colaboradores utilizaram um agonista do IGF-1, o JB-3, em camundongos, administrando a droga do 12º ao 17º dia de vida a cada 6 horas ⁵¹ e demonstraram que: 1) doses múltiplas e por longo período são bem toleradas e não aumentam a mortalidade dos animais 2) o JB-3 impede a ativação da tirosina-quinase do receptor de IGF-1 de forma dose dependente, 3) IGF-1 está altamente envolvido no desenvolvimento da RIO, 4) IGF-1 apresenta-se como novo alvo de estudos para o controle da RIO.

Smith e colaboradores testaram o uso de doses progressivas de JB-3 (10, 50 e 100 ug/kg/dia), obtendo máxima evidência de inibição da neovascularização retiniana com doses de 100µg/kg/dia ⁵¹.

Nós contactamos Dr. Louis Smith da Universidade de Harvard para informações em relação à compra da JB-3 e fomos informados de que nos seus estudos, ela utilizou uma amostra da droga doada pelo Dr Oldroyd do Reino Unido. Ao contactarmos Dr Oldroyd, ele nos orientou a realizar a compra do JB-3 na *Bachem Chemicals*. Ao entrarmos em contato com a empresa, fomos informados de que a droga JB-3 não está mais no mercado e foi substituída pelo JB-1, outro antagonista do receptor de IGF-1. A própria empresa nos enviou

uma série de referências demonstrando a eficácia da droga como antagonista do receptor de IGF-1 ^{49,50}.

Assim, optamos pelo uso do JB-1, cuja dose de administração foi calculada considerando-se o peso dos ratos ao nascimento em gramas, e padronizamos a dose de 1µg/dia diluída em um volume de 0,01 ml, administrado por via subcutânea com seringa de insulina e agulha 29 gauge por se tratar de ratos filhotes.

3.5. Tamanho da amostra

O tamanho da amostra de 15 filhotes por grupo foi determinada utilizando-se critérios padronizados de análise de poder da amostra, no entanto, utilizamos 17 filhotes por grupo. A escolha do tamanho da amostra de 17 filhotes foi baseado em estudos prévios que detectaram o efeito do tratamento com ibuprofeno e Indometacina em níveis de IGF-1 no vítreo⁴⁷, considerando-se a diferença dos níveis entre os grupos como resultado final primário. Estimamos que nossa amostra seja suficiente para detectar 50% de aumento, com poder de teste de 80% e um nível de significância (alfa) bicaudal de 0,02, utilizando-se a diferença entre as médias.

3.6. Coleta das amostras

Nove ratos de cada grupo foram selecionados aleatoriamente para a realização das dosagens dos fatores de crescimento. Estes ratos tiveram ambos os olhos enucleados e colocados em solução salina (pH 7,4) e em gelo. Destes olhos foram obtidos fluido vítreo e retina. Para a extração do fluido vítreo utilizouse uma seringa de insulina de 0,5 mL para a aspiração do mesmo, que imediatamente foi armazenado em tubos de *Eppendorf* em gelo. Para obter material suficiente para a realização das análises, a quantidade de vítreo obtida em quatro olhos foi somada para representar uma amostra. Nenhuma das amostras de vítreo foi contaminada com sangue. As amostras de retina foram obtidas através de sua dissecção e imediata colocação em tubos de polipropileno e congeladas. Obtiveram-se quatro amostras de fluido vítreo e retina em cada grupo.

Dos oito ratos restantes de cada grupo, três foram utilizados para a realização da perfusão cardíaca com fluoresceína-dextran, três ratos foram utilizados para a realização da coloração dos vasos retinianos pelo método de ADPase (totalizando seis imagens por grupo) e dois foram separados para a

determinação dos fatores angiogênicos a anti-angiogênicos por PCR em tempo real.

As amostras de sangue foram coletadas por decapitação, colocadas em tubos de *Eppendorf* em gelo e processadas após trinta minutos para permitir a formação de coágulos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 3000 rpm por 20 minutos para permitir a coleta do soro. As amostras de vítreo e soro foram estocadas a -20°C e as amostras de retina estocadas a -80°C até o dia da realização das análises.

3.7. Determinação de VEGF, sVEGFR-1 e IGFs

No dia da realização dos experimentos, as retinas foram homogenizadas em gelo, centrifugadas a velocidade de 5000 rpm a 4°C por 20 minutos e então filtradas. Os níveis de VEGF, sVEGFR-1, IGF-1 foram determinados no sangue, fluído vítreo e homogenizados de retina, utilizando-se os kits de ELISA específicos para ratos/ camundongos e comercialmente disponíveis (*R & D Systems*, Minneapolis, MN para VEGF e sVEGFR-1 e *Diagnostic Systems Laboratories*, Webster,TX para IGF-1 e IGF-2). As dosagens de IGF-2 foram

realizadas no soro, mas não no fluido vítreo e retina pela limitação da quantidade da amostra. Os níveis de fatores de crescimento obtidos nas amostras de retina foram calculadas com base nos níveis de proteínas totais de acordo com o método de Bradford (*BioRad Laboratories*, Hercules CA)

3.8. Perfusão com fluoresceína-dextran

Para determinar o desenvolvimento vascular retiniano, examinou-se imagens da retina coradas com fluoresceina e digitalizadas por computador. Como já mencionado, três ratos em cada grupo foram aleatoriamente escolhidos para a realização de perfusão cardíaca com fluoresceína. Estes ratos foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg) via intraperitoneal, seguindo-se da realização de uma esternotomia mediana. Identificouse o ventrículo esquerdo e injetou-se com uma seringa de tuberculina e uma agulha de 27 gauge, 1 ml de formaldeído contendo 50 mg de fluoresceínadextran com peso molecular de 2 x10⁶ (*Sigma Chemicals* Co. St Louis, MO). Dextrans com menor peso molecular ou tinta da Índia não foram usados, pois já foi demonstrado que estas substâncias extravasam dos vasos^{52,53}. Antes do uso, a solução de fluoresceína-dextran foi centrifugada por cinco minutos sob 10000

rpm. O uso da perfusão com fluoresceína-dextran para examinar a vascularização retiniana é vantajosa, pois é uma técnica rápida, que apresenta baixa fluoresceína extravasada e, assim, consegue corar todos os vasos incluindo tufos. Após a injeção intracardíaca, os olhos foram enucleados e colocados em paraformaldeído a 4% por 24 horas, após o qual, removeu-se o cristalino e a retina foi dissecada da esclera e posicionada aberta em lâminas sob solução de gelatina-glicerol (Sigma-Chemicals Co.) e cobertas com lamínulas. Em seguida, estas retinas foram examinadas em microscópio de fluoresceína e fotografadas. O desenvolvimento da vasculatura retiniana foi observado, assim como a extensão da vaso-obliteração ou vaso-proliferação foi comparada entre os grupos de diferentes idades e tratamentos. As imagens digitais foram capturadas pelo microscópio Olympus BH-2 (Mc Bain Instruments, Chartsworth, CA) em um aumento de 10X e salvas em computador Dell Optiplex GX280 (Dell Computer Corporation, Dallas, TX), utilizando-se o software SPOT (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI)

3.9.Coloração das retinas pelo método de ADPase

Após o sacrifício três ratos tiveram seus olhos enucleados e suas retinas dissecadas, abertas em lâminas e coradas pelo método de ADPase descrito por

Penn e colaboradores ^{28,53} que representa uma adaptação previamente descrita do método desenvolvido por McLeod e Lutty ⁵⁴. Este método colore apenas o endotélio vascular da retina e suas células precursoras em ratos desta idade^{54,55,56,}. As imagens digitais foram capturadas pelo mesmo equipamento acima descrito em um aumento de 4X.

3.10. Extração de DNA

Após o sacrifício dos animais por decaptação, realizou-se a enucleação dos olhos utilizando-se um fórceps de íris e uma tesoura para a separação dos olhos e dos tecidos ao redor, nervo e músculos. Os cristalinos foram removidos com bisturi estéril descartável e as retinas periféricas foram coletadas, armazenadas em tubos protetores próprios para extração de RNA (Qiagen, Inc., Valencia, CA) e colocadas imediatamente em reagente Trizol gelado e armazenadas em nitrogênio liquido. As amostras foram mantidas refrigeradas a menos 80°C até o dia da extração do RNA.

O RNA foi isolado da retina por homogenização em reagente Trizol (Life Technologies, Inc., Gaithersberg, MD). O reagente TriZol é um reagente pronto para o uso no isolamento do RNA total de células e tecidos. O reagente é feito de fenol e isotiocianato de guanidina e este método representa uma melhoria em

relação ao método de isolamento de RNA por etapa única desenvolvido por Chomczynski e Sacchi ⁵⁷; e já foi previamente utilizado no laboratório ^{58,59,60}. Resumidamente, as etapas são as seguintes: clorofórmio é adicionado à amostra e estas são centrifugadas por 20 minutos a 4°C. O RNA de fase aquosa se precipita em 0,5 mL de isopropanol e é separado pela centrifugação a 4°C. O RNA obtido é lavado com etanol 75% e dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato (*DEPC-treated water*). A integridade do RNA é confirmada em gels de 1% de agarose através do tingimento das bandas de RNA ribossômico com brometo de etídio. Este RNA é quantificado em 260 nm utilizando-se um espectrofotômetro de Beckman e diluído a 1 μg/μL. RNA de alta qualidade é gerado através da utilização do micro kit RNAeasy (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Esta técnica garante máximo aproveitamento de pequenas amostras e permite ótimo desempenho para a aplicação do PCR em tempo real.

3.11. PCR em tempo real

O RNA total foi extraído da retina utilizando-se o kit RNA Pro solution (MP Bio, Sólon, OH) com o instrumento Fast Prep-24 (MP Bio), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. A amostra de RNA foi quantificada em 260nm utilizando-se um espectofotômetro de Beckman e diluído para 1 µg/ µL.

A purificação do RNA foi realizado com o *kit RNEasy mini cleanup* (Quiagen, Valencia, CA) seguido do tratamento com DNase I (Quiagen). A reação de Transcrição Reversa foi realizada utilizando-se o *RT*² *First Strand kit* adquirido da SABioscience, Frederick, MD. O PCR em tempo real foi realizado em duplicata utilizando-se sistema de matriz de PCR para fatores de crescimento relacionados à angiogênese e à inibição da angiogênese (SABioscience), utilizando-se o aparelho BioRad IQ5 (BioRad Laboratories). Cada placa de matriz do PCR consiste em um painel de cinco genes de controle (housekeeping genes) para normalizar os dados da matriz do PCR, permitir a replicação dos controles do DNA genômico e detectar possíveis contaminações com alto nível de sensibilidade, e replicar os controles positivos do PCR para testar a eficiência da reação de PCR, utilizando-se uma sequência de DNA artificial conhecida e um primer específico que a detecta.

Os cálculos foram realizados exportando os dados para uma planilha Excel [®] utilizando-se a *SABioscience PCR Array Data Analysis Excel Template* e alimentando os dados da amplificação do PCR em tempo real no portal da web *SABioscience RT*² *Profiler PCR Array Data Analysis*.

O PCR quantitativo foi baseado no valor de limite do ciclo (Ct). O gene foi considerado não detectável se o valor de Ct foi ≥ 35. O Delta Ct para cada gene foi calculado como Ct (gene de interesse) – Ct (gene de controle)

3.12. Análise estatística

Dados foram coletados e arquivados em computador e analisados pelo software SPSS versão 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). A estatística descritiva foi realizada para cada variável medida por grupo e tempo. Os dados foram apresentados como média ± SEM (erro padrão da média). A eficácia em relação à supressão dos fatores de crescimento sistêmicos e oculares foi realizada pela comparação entre o grupo controle (solução fisiológica), com JB-1 (3 doses) e com JB-1 (7 doses), utilizando-se o teste de ANOVA para dados com distribuição normal e Kruskall-Wallis para dados sem distribuição normal, após a realização do teste de Barlett para a verificação de igualdade de variâncias. A análise Post hoc foi realizada utilizando-se os testes Turkey, Bonferoni e Student -Newman-Keuls. Para a comparação entre os grupos mantidos em ar ambiente e submetidos a oxigênio, utilizou-se o teste t não pareado para os dados com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para os dados sem distribuição normal, após o teste de Levene para equalização das variâncias. Um valor p menor ou igual a 0,05 foi considerado como estatisticamente significante.

3.13. Cuidados emergênciais

Qualquer problema com os animais a qualquer hora do dia, incluindo noites e finais de semana foi reportado imediatamente ao investigador principal ou pessoal envolvido na pesquisa. Caso necessário, o veterinário era acionado prontamente.

3.14. Treinamento de pessoal

A coordenadora do estudo, Sra Kay Beharry, apresenta mais de 25 anos de experiência em pesquisas experimentais com animais, incluindo pesagem, realização de suas medidas antropométrica, alimentação e manuseio dos animais, coleta de amostras de sangue, detecção de dor ou qualquer estresse sofrido pelo animal, realização de sacrifícios e necrópsias. Todos os pesquisadores envolvidos no trabalho estavam cientes e familiarizados com as normas da USDA (United States Department of Agriculture) e as políticas da IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee). Os fellows e assistentes de pesquisa foram inicialmente treinados e receberam certificação apropriada.

em segurança no laboratório, ética em pesquisa, saúde ocupacional, cuidados com animais de experimentação, além do uso humanizado, e treinamento em técnicas de antissepsia e técnicas cirúrgicas para a realização de procedimentos pertinentes à pesquisa, assim como a eutanásia, antes do começo dos experimentos. Todos os envolvidos na pesquisa foram devidamente orientados para minimizar ou evitar qualquer desconforto ou dor nos animais. Todos os procedimentos padrões realizados foram acompanhados e de livre acesso pelo veterinário responsável, oficiais do laboratório e outros membros da IACUC, para evitar qualquer tipo de violação do protocolo.

3.15.Método de eutanásia

Todas as ratas mães foram sacrificadas utilizando-se uma dose letal de pentobarbital sódico (150-200mg/kg).

Os ratos filhotes que foram submetidos à perfusão cardíaca com fluoresceína para corar os vasos da retina e os ratos usados para a realização da coloração da retina pelo método de ADPase foram sacrificados após o procedimento com dose letal de pentobarbital sódico (40mg/kg) e os ratos filhotes que foram usados para coleta de amostras para a realização das dosagens de fatores de crescimento foram sacrificados por decapitação, pois o

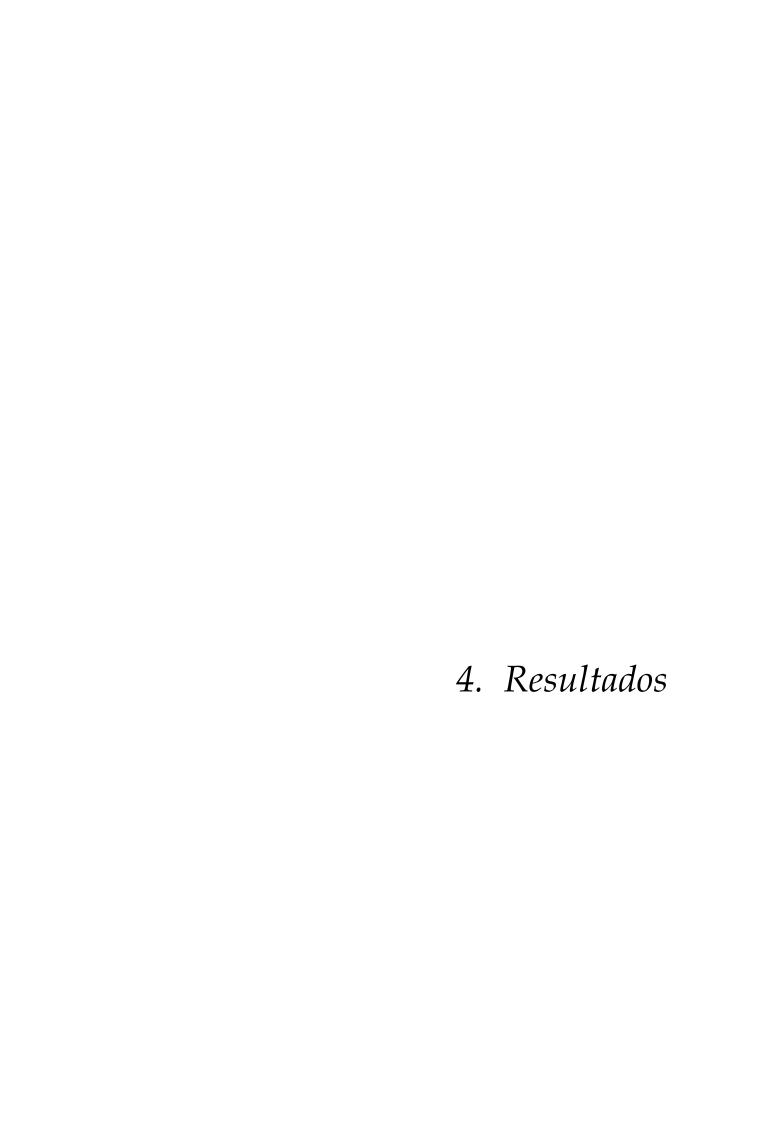
uso de agentes anestésicos como o pentobarbital sódico podem causar queda da pressão arterial, fluxo sanguíneo, e oxigenação de tecidos, alterando os resultados de nossos experimentos. No entanto, a decapitação sem anestesia, não só resulta em obtenção de sangue sem nenhuma influência química, como o volume de sangue obtido é maior, reduzindo assim, o número de ratos que devem ser sacrificados.

3.16. Quantificação da neovascularização retiniana pela pontuação da retina (score)

A neovascularização foi determinada como área calculada (µm²) de crescimento vascular retiniano exacerbado que se estende em direção aos corpos ciliares em cada quadrante das retinas dissecadas e abertas, correspondendo a um total de 40 medidas por grupo. A área foi diferenciada nas imagens de retina utilizando-se um recurso de seleção da imagem presente no software SPOT e assim a área total foi quantificada.

Para se determinar uma pontuação (score) dos achados sugestivos de retinopatia, utilizou-se uma versão modificada do sistema de pontuação desenvolvido por Higgins e colaboradores⁶¹. O critério de pontuação incluiu a presença de tufos vasculares, excessivo crescimento retiniano (vasos crescendo

além da zona avascular em direção aos corpos ciliares), hemorragia retiniana, tortuosidade de vasos e persistência da artéria hialóidea⁶². Para a determinação da pontuação, cada retina foi dividida em 12 seções lineares representativas de horas do relógio. Uma pontuação igual a "0" foi dada caso nenhuma das características descritas fosse observada em nenhuma das horas de relógio. Pontuação igual a 1 foi dada caso os achados estivessem presentes em até 3 horas do relógio, pontuação de 2 se os achados estivessem presentes em 3 a 5 horas do relógio, pontuação de 3 caso 6 a 8 horas estivessem acometidas e 4 se 9 a 12 horas do relógio apresentassem alterações características de retinopatia. A pontuação total (score) de retinopatia foi calculada pela soma dos pontos para cada critério e uma pontuação maior de 12 foi considerada retinopatia grave.



4. RESULTADOS

4.1. Crescimento somático

Inicialmente observou-se que a simples exposição dos ratos aos ciclos de H/H (Hiperóxia/Hipóxia) levaram a uma diminuição no peso corpóreo e crescimento linear no P14 quando comparados com os grupos que permaneceram em ar ambiente (AA) (Gráficos 1 e 2).

Os ratos submetidos ao tratamento com JB-1x3 tanto em AA quanto nos expostos aos ciclos de H/H apresentaram maiores pesos e maior crescimento linear que o grupo controle de solução salina no P14 (Gráficos 1 e 2). O tratamento com JB-1x7 e ciclos de H/H levou os ratos a apresentarem menores pesos e menor crescimento linear quando comparados aos grupos que receberam solução salina e JB-1x3 no P14 (Gráficos 1 e 2).

No P21, o peso e o crescimento linear mantiveram-se suprimidos com o tratamento com JB-1x7 em comparação com os demais grupos (Gráficos 3 e 4).

4.2. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Avaliando-se as dosagens séricas do VEGF, o tratamento com JB-1x3 em AA suprimiu os seus níveis quando comparado com o grupo de solução salina no P14. No P21, os níveis séricos de VEGF estão aumentados no grupo controle (solução salina) submetido aos ciclos de H/H quando comparados com AA. O tratamento com JB-1x7 nos ratos submetidos ao ciclo de H/H resultou em um aumento dos níveis séricos de VEGF, mas este aumento não apresentou significância estatística (Tabela 1).

Na retina, somente o tratamento com JB-1x7 em AA diminuiu os níveis de VEGF comparado com grupo de solução salina em AA no P14. Nos grupos submetidos ao ciclo de H/H, o grupo controle (solução salina) apresentou menores níveis de VEGF comparado com o grupo que recebeu solução salina e manteve-se em AA. O tratamento com JB-1x3 em O₂ aumentou os níveis de VEGF comparado com o grupo controle em O₂ no P14 (Gráficos 5 e 7).

No vítreo, no P14 o grupo que recebeu solução salina e foi submetido aos ciclos de H/H apresentou menor nível de VEGF comparado com o grupo controle mantido em AA. O tratamento com JB-1x3 em AA diminuiu os níveis de VEGF no vítreo comparado com grupo controle em AA (Gráfico 6). No P21, os níveis de VEGF no vítreo foram, em geral, mais altos nos ratos

submetidos aos ciclos de H/H comparado com os mantidos em AA, mas estes resultados não apresentaram significância estatística (Gráfico 8)

4.3. Fator de crescimento Insulin – like I (IGF-1)

No P14, os níveis séricos de IGF-1 apresentaram-se diminuídos em todos os grupos submetidos aos ciclos de H/H comparados com os grupos mantidos em AA. Não houve diferença estatisticamente significante entre os níveis séricos de IGF-1 entre os grupos expostos ao oxigênio. No P21, ambos os grupos, JB-1x3 e JB-1x7 submetidos aos ciclos de H/H apresentaram níveis séricos de IGF-1 diminuídos comparados com o grupo controle de solução salina em O₂ (Tabela 1).

Na retina, no P14, o tratamento com JB-1x3 em AA apresentou níveis diminuídos de IGF-1 comparado com solução salina e tratamento com JB-1x7. Nos grupos submetidos aos ciclos de H/H, os níveis de IGF-1 na retina apresentaram-se diminuídos no grupo controle em relação ao AA e aumentados no grupo que recebeu a droga JB-1x7 comparando-se com solução salina e JB-1x3 em O₂ (Gráfico 9). No P21, um efeito oposto foi observado em ambos os grupos de tratamento em AA e um aumento dos níveis de IGF-1 no grupo JB-1x7 comparado com solução salina quando em O₂ (Gráfico 11).

No vítreo, os níveis de IGF-1 apresentaram-se aumentados com o tratamento JB-1x7 em AA e nos grupos submetidos aos ciclos de H/H no P14, sendo observado um efeito semelhante no P21 (Gráfico 10 e 12).

4.4. Receptor solúvel do fator de crescimento endotelial vascular (sVEGFR-1)

No P14, notou-se um aumento dos níveis séricos do sVEGFR-1 nos grupos que receberam tratamento com a droga JB-1 tanto nos grupos que permaneceram em ar ambiente quanto nos submetidos aos ciclos de H/H. No P21, o aumento dos níveis séricos do sVEGFR-1 manteve-se presente no grupo que recebeu JB-1 por 3 dias (JB-1x3), mas um efeito inverso foi observado no grupo que recebeu a droga por 7 dias (JB-1 x7) (Tabela 1).

Na retina, no P14, os níveis de sVEGFR-1 apresentavam-se diminuídos no grupo controle (solução salina) submetido ao ciclo de H/H comparado ao grupo controle que permaneceu em AA. Já no grupo que recebeu tratamento com JB-1x3, os níveis retinianos de sVEGFR-1 estavam aumentados tanto em AA quanto no grupo submetido ao O₂, quando comparado à solução salina. O tratamento mais prolongado (JB-1x7) apresentou resultado oposto, suprimindo os níveis de sVEGFR-1, fato este que se repetiu no P21 (Gráficos 13 e 15).

No vítreo, somente os grupos que receberam tratamento com JB-1x7 (em AA ou submetido ao O_2) suprimiram os níveis de sVEGFR-1, tanto no P14 quanto no P21. (Gráficos 14 e 16).

4.5. Fator de crescimento Insulin-like II (IGF-2)

No P14, o tratamento com JB-1x7 nos ciclos de H/H apresentou uma diminuição dos níveis séricos de IGF-2 comparado com os grupos JB-1x3 e solução salina. Notou-se um efeito rebote no P21 com o grupo JB-1x7 em O₂ comparado com JB-1x3 e solução salina (Tabela 1).

4.6. Quantificação da neovascularização retiniana

Na quantificação da neovascularização retiniana pelo método de medida da área calculada de hiper-crescimento vascular pelo software SPOT, observou-se que no P14, a vascularização retiniana apresentou-se diminuída no grupo JB-1x3 em O_2 (1,4 X 10^5) comparado com grupo solução salina em AA (1,7 X 10^5 , p<0,05), solução salina e ciclos de H/H (2,0 X 10^5 , p < 0,01) e com o grupo JB-1x7 tanto em AA (1,5 X 10^5 , p< 0,05) quanto submetidos aos ciclos de H/H (1,7 X 10^5 , p< 0,05) (Figuras 8 e 10).

No P21, a área de neovascularização retiniana apresentou-se mais extensa no grupo solução salina submetido ao ciclo de H/H (2,5 X 10⁵, p< 0,01) comparados com o grupo controle AA (1,8 X 10⁵). Um padrão de

neovascularização também foi observado no grupo JB-1x7 submetido ao ciclo de H/H (2,6 X 10⁵, p<0,01), mas não no grupo JB-1x3 (Figura 9 e 11).

Quando realizada a análise da patologia vascular pelo método de score da retina, demonstrou-se que 90% das retinas do grupo solução salina e ciclo de H/H no P14 apresentavam score >12. Isto também estava associado à presença de persistência da artéria hialóide, tortuosidade vascular, hemorragias e crescimento vascular exuberante (Figura 10). Poucos tufos vasculares foram observados.

O tratamento com JB-1 x3 e JB-1 x 7, no P14, apresentou score < 12 em todas as retinas analisadas (Figuras 10 B e C)

No P21, 70% das retinas do grupo que recebeu solução salina e foi submetido aos ciclos de H/H apresentaram score > 12 e estavam associadas a pontos de hemorragia, vasos tortuosos e crescimento vascular exuberante (Figura 11 A). No entanto, o grupo JB-1 x7 submetido ao ciclo de H/H apresentou score > 12 em uma porcentagem maior das retinas, atingindo cerca de 90% delas, sendo caracterizado por tortuosidades vasculares, persistência da hialóide e crescimento vascular exacerbado (Figura 11 C).

4.7. Expressão gênica dos fatores relacionados à angiogênese

As tabelas 2 a 7 demonstram a diferença dos genes relacionados à angiogênese nas retinas nos P14 e P21 entre os grupos de tratamento em relação ao grupo controle (solução salina em AA).

No P14, a expressão de RNAm de todos os genes estão diminuídos no grupo solução salina e ciclo de H/H, exceto o PDGFB (fator de crescimento beta derivado das plaquetas). O PDGFB exerce papel importante na formação e remodelação de vasos sanguíneos. Os grupos de tratamento com JB-1x3 em AA e submetido a ciclo de H/H preservaram a expressão de VEGFA, ao contrário do tratamento com JB-1x7 (Tabela 2).

No P21, um efeito oposto foi observado com o grupo de solução salina. O tratamento com JB-1x3 tanto em AA quanto nos ciclos de H/H diminuiu a expressão do RNAm de VEGFA, enquanto o tratamento com JB-1 x7 não (Tabela 3).

A expressão dos reguladores positivos da angiogênese estava diminuída nas retinas expostas aos ciclos de H/H e que receberam solução salina no P14 e P21(Tabelas 4 e 5). Uma diminuição importante da expressão gênica do RUNX1 (fator transcriptor 1 relacionado ao gene runt) foi notada no P14 em todos os grupos, principalmente naqueles submetidos aos ciclos de H/H e que receberam o JB-1 (Tabela 4), mantendo-se suprimido no P21 nos grupos tratados com solução salina e ciclos de H/H, mas não nos grupos tratados com JB-1. Efeito semelhante foi observado com o gene SHH (Sonic Hedgehog), um gene retiniano de angiogênese. Este efeito praticamente desapareceu no P21, com exceção dos grupos que receberam solução salina (Tabela 5).

O tratamento com JB-1 em AA e ciclos de H/H aumentaram a expressão dos genes relacionados à angiogênese no P21 (Tabela 5) .

Os efeitos nos reguladores negativos da angiogênese foram variáveis, mas os genes da família da prolactina foram mais afetados pelo ciclo H/H e tratamento com JB-1. Entre os genes da família TIMP (inibidor tecidual das metaloproteinases), o TIMP-2 foi o mais afetado pelo uso de JB-1x3 no P21 (Tabelas 6 e 7).

Tabela 1 - Efeitos dos diferentes tratamentos nos níveis séricos dos fatores de crescimento

	Solução Salina		JB1	JB1 x3		1 x7
	AA	O_2	AA	O_2	AA	O_2
VEGF						
(pg/mL)						
P14	28,3± 3,6	17,9±4,3	12,3±3,8*	16,5±2,8	21,6±2,5	27,5±3,0
P21	6,5± 3,3	9,4±3,0	9,7±3,3	4,4±2,9	8,8±1,9	16,6±3,0
sVEGFR-						
1 (pg/mL)						
P14	1224,1±363,6	1461,4±166,1	4304,5±366,8*	3562,5±439,7#	$4428,3{\pm}434,2\tau$	5834,4±903,5#∂
P21	1923,7±108,0	1877,5±328,8	6499,6±1365,0*	6011,8±800,2#	387,7±57,3	401,7±31,7
IGF-1						
(ng/mL)						
P14	68,8±11,2	39,7±6,0**	75,6±6,6	$\textbf{38,2} {\pm} \textbf{2,8} \partial$	130,2±28,9	49,3±3,1∂
P21	144,2±32,9	246,4±27,3	182,7±12,3	145,7±24,0#	120,5±8,1	138,6±26,4#
IGF-2						
(ng/mL)						
P14	129,8±1,2	147,5±10,4	160,2±13,5	144,3±8,2	154,4±16,9	104,1±3,8#
P21	131,2±4,5	131,6±1,2	132,0±1,4	131,9±0,9	128,7±1,9	166,0±3,2#

n=8 amostras por grupo. Dados demonstram média ± EPM

^{*} p <0,01

[#] p <0,05 vs Sal H/H

τ p <0,001 vs Sal AA

 $[\]partial$ p < 0,05 vs AA

^{**} p < 0,05 vs AA

Tabela 2 - Expressão gênica dos fatores de crescimento angiogênicos na retina dos ratos no 14º dia de vida.

Gene	14 DO ₂	14 DAA	14DO ₂	14 DAA	14DO ₂
	Sal	JB1x3	JB1x3	JB1x7	JB1x7
CSF3	-11,8	-29,1	-9,5	-10	-20,4
FGF1	-1,6	-1,4	-1,4	-1,3	1,0
FGF2	-9,1	-4	-3,3	-3,4	-2,5
LEP	-4,3	-2,5	-2,6	-1,6	-1,9
PDGFB	1,0	-1,1	-2,0	-1,7	1,1
PGF	-1,2	1,0	-2,6	1,1	1,2
TGFA	-1,6	1,0	-1,3	1,4	-1,2
VEGFA	-1,0	1,0	1,6	-1,1	-1,5

Os dados são apresentados como mudança de vezes em relação aos grupos controles no 14°. e 21°. dias. Os dados foram corrigidos utilizando-se de 5 genes de controle. Os genes de interesse são: CSF3, fator estimulador de colônias 3, FGF1-2, fator de crescimento de fibroblastos 1 – 2, LEP, leptina; PDGFB, fator de crescimento beta derivado das plaquetas ; TGFA, fator de crescimento transformador alfa; e VEGFA, fator de crescimento endotelial vascular tipo A

Tabela 3- Expressão gênica dos fatores de crescimento angiogênicos na retina dos ratos no 21º dia de vida.

Gene	21 DO ₂	21 DAA	21DO ₂	21 DAA	21 DO ₂
	Sal	JB1x3	JB1x3	JB1x7	JB1x7
CSF3	5,1	-7,5	-3,0	4,8	3,9
FGF1	2,0	-1,3	-1,2	11,3	1,2
FGF2	7,0	-2,5	-4,4	1,6	1,7
LEP	17,7	-11,5	-21,3	1,6	4,1
PDGFB	1,8	-1,2	-1,9	-8,7	-1,0
PGF	1,1	1,3	-1,9	10,7	1,7
TGFA	2,2	-2,4	-2,1	3,6	1,3
VEGFA	5,0	-1,0	-1,4	6,7	1,1

Os dados são apresentados como mudança de vezes em relação aos grupos controles no 14°. e 21°. dias. Os dados foram corrigidos utilizando-se de 5 genes de controle. Os genes de interesse são: CSF3, fator estimulador de colônias 3, FGF1-2, fator de crescimento de fibroblastos 1 – 2, LEP, leptina; PDGFB, fator de crescimento beta derivado das plaquetas ; TGFA, fator de crescimento trasnfornador alfa; e VEGFA, fator de crescimento endotelial vascular tipo A.

Tabela 4 - Expressão gênica dos reguladores positivos da angiogênese na retina dos ratos no 14º dia de vida.

Gene	14 DO ₂	14 DAA	14 DO ₂	14 DAA	14DO ₂
	Sal	JB1x3	JB1x3	JB1x7	JB1x7
KDR	-1,0	1,2	2,0	-1,2	-1,2
NTRK2	-1,6	-1,5	-1,1	-1,8	-1,3
PTPRJ	-1,1	-1,2	-1,1	1,0	1,1
RASA1	1,2	1,4	1,3	1,0	-1,1
RHOB	-1,1	-1,2	-1,7	-1,0	-1,3
RUNX1	-6,2	-11,8	-68,1	-8,0	-44,5
SHH	-1,6	-2,6	-3,3	-2,8	-1,1

Os dados são apresentados como mudança de vezes em relação aos grupos controles no 14°. e 21°. dias. Os dados foram corrigidos utilizando-se de 5 genes de controle. Os genes de interesse são: KDR; receptor neurotrófico da tirosina-quinase tipo 2; PTPRJ, receptor neurotrófico da tirosino-fosfatase tipo J; RASA1, RASp21- ativadores protéicos (proteína ativadora da GTPase); RHOB, gene homólogo tipo B da família RAS; RUNX1, fator transcriptor 1 relacionado ao gene runt ; e SHH, *sonic hedgehog*.

Tabela 5- Expressão gênica dos reguladores positivos da angiogênese na retina dos ratos no 21º dia de vida

Gene	21 DO ₂	21 DAA	21 DO ₂	21 DAA	21 DO ₂
	Sal	JB1x3	JB1x3	JB1x7	JB1x7
KDR	1,7	1,4	2,0	23.5	1,6
NTRK2	-1,3	1,1	1,2	10,2	1,5
PTPRJ	-1,2	1,0	1,5	7,3	1,2
RASA1	-1,1	1,6	1,1	16,7	1,2
RHOB	-1,2	1,2	1,4	7,9	1,1
RUNX1	-1,5	1,8	1,1	5,7	2,3
SHH	-1,0	1,5	1,2	8,3	1,0

Os dados são apresentados como mudança de vezes em relação aos grupos controles no 14°. e 21°. dias. Os dados foram corrigidos utilizando-se de 5 genes de controle. Os genes de interesse são: KDR; receptor neurotrófico da tirosina-quinase tipo 2; PTPRJ, receptor neurotrófico da tirosino-fosfatase tipo J; RASA1, RASp21- ativadores protéicos (proteína ativadora da GTPase); RHOB, gene homólogo tipo B da família RAS; RUNX1, fator transcriptor 1 relacionado ao gene runt ; e SHH, *sonic hedgehog*.

Tabela 6 - Expressão gênica dos reguladores negativos da angiogênese na retina dos ratos no 14º dia de vida

Gene	14 DO ₂	14 DAA	14 DO ₂	14 DAA	14 DO ₂
	Sal	JB1x3	JB1x3	JB1x7	JB1x7
BAI	-2,2	-1,3	-2,3	-1,1	-1,1
COL18A1	-1,2	1,0	-1,0	1,1	1,6
COL4A3	2,3	5,0	2,6	2,2	4,4
CRHR2	-1,3	-1,8	-1,1	-1,8	-1,2
FN1	-2,3	-4,8	-6,8	-3,2	-3,5
PLG	-10,0	-2,4	-6,1	-2,8	-4,5
PRL	-18,5	-10,9	-6,1	-2,7	-3,7
PRL7D1	-8,4	-3,9	-5,2	-3,2	-3,8
RNH1	1,0	1,6	1,1	-1,3	-1,1
THBS1	-1,5	-1,7	-4,7	-1,5	-2,4
TIE1	-1,0	-1,7	-2,4	1,1	-1,9
TIMP1	1,1	1,3	1,2	-1,1	1,3
TIMP2	-1,6	-2,0	-1,8	-1,8	-2,0
TIMP3	1,2	1,1	-1,1	1,1	1,9
TIMP4	-1,2	-1,8	1,1	-2,3	-1,4

Os dados são apresentados como mudança de vezes em relação aos grupos controles no 14°. e 21°. dias. Os dados foram corrigidos utilizando-se de 5 genes de controle. Os genes de interesse são: BAI, inibidor da angiogênese específico do Cérebro; COL18A1, colágeno tipo XVIII, alfa 1; COL4A3, colágeno tipo IV, alfa 3; CRHR2, receptor tipo 2 do hormônio liberador de corticotrofina; FN1, fibronectina; PRL, prolactina; PRL7D1, família 7 da prolactina, subfamília D, membro 1; RNH1, inibidor tipo 1 da ribonuclease/ angiogenina; THBS, trombospondina tipo 1; TIE1, tirosina quinase com domínios imunoglobulia-like e EGF-like; e TIMP 1-4, inibidor tecidual das metaloproteinases 1-4.

Tabela 7 - Expressão gênica dos reguladores negativos da angiogênese na retina dos ratos no 21º dia de vida

Gene	21 DO ₂	21 DAA	21 DO ₂	21 DAA	21 DO ₂
	Sal	JB1x3	JB1x3	JB1x7	JB1x7
BAI	-1,2	1,7	1,1	13,5	1,5
COL18A1	-1,1	1,3	-1,2	-52,1	1,4
COL4A3	1,7	2,4	1,3	17,6	2,3
CRHR2	-1,9	1,1	-1,5	3,1	-1,1
FN1	1,2	1,6	1,9	11,4	1,1
PLG	-10,2	-11,5	-41,0	-1,1	-1,8
PRL	-33,9	-22,1	-41,0	-1,1	-1,8
PRL7D1	-14,3	-11,5	-21,3	1,6	1,2
RNH1	2,0	2,4	1,8	1,1	2,3
THBS1	1,1	-1,2	-1,1	-16,0	-1,5
TIE1	-1,5	-1,2	-1,7	6,7	-1,3
TIMP1	1,1	1,2	1,1	14,3	1,4
TIMP2	1,1	-52,4	1,0	8,5	1,0
TIMP3	-1,0	1,0	-1,4	6,9	-1,1
TIMP4	1,1	1,4	-1,1	10,7	-1,0

Os dados são apresentados como mudança de vezes em relação aos grupos controles no 14°. e 21°. dias. Os dados foram corrigidos utilizando-se de 5 genes de controle. Os genes de interesse são: BAI, inibidor da angiogênese específico do Cérebro; COL18A1, colágeno tipo XVIII, alfa 1; COL4A3, colágeno tipo IV, alfa 3; CRHR2, receptor tipo 2 do hormônio liberador de corticotrofina; FN1, fibronectina; PRL, prolactina; PRL7D1, família 7 da prolactina, subfamília D, membro 1; RNH1, inibidor tipo 1 da ribonuclease/ angiogenina; THBS, trombospondina tipo 1; TIE1, tirosina quinase com domínios imunoglobulia-like e EGF-like; e TIMP 1-4, inibidor tecidual das metaloproteinases 1-4.

Gráfico 1- Efeito do ciclo de oxigênio no peso dos ratos em gramas aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento.

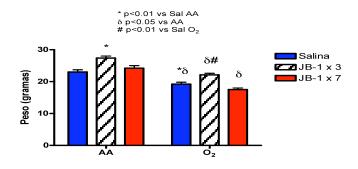
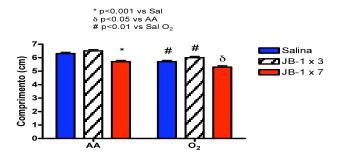


Gráfico 2- Efeito do ciclo de oxigênio no comprimento dos ratos em centímetros aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento.



Resultados

Gráfico 3- Efeito do ciclo de oxigênio no peso dos ratos em gramas aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento.

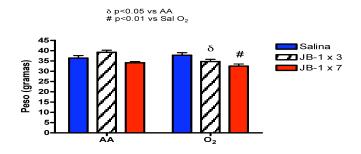


Gráfico 4- Efeito do ciclo de oxigênio no comprimento dos ratos em centímetros aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento.

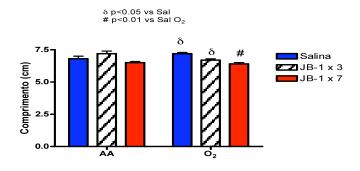


Gráfico 5- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de VEGF na retina dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento.

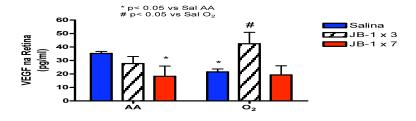


Gráfico 6- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de VEGF no fluido vítreo dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

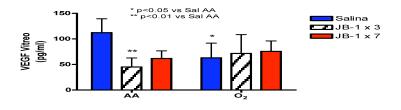


Gráfico 7- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de VEGF na retina dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

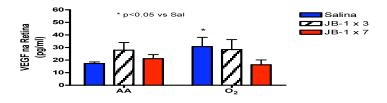


Gráfico 8- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de VEGF no fluido vítreo dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

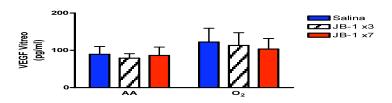


Gráfico 9- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de IGF-1 na retina dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

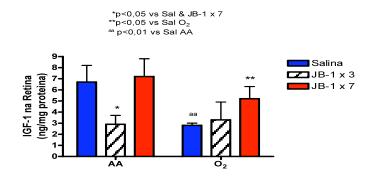


Gráfico 10- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de IGF-1 no fluido vítreo dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

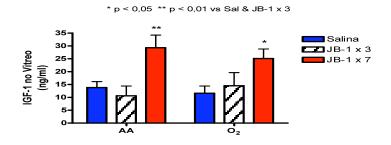


Gráfico 11- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de IGF-1 na retina dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

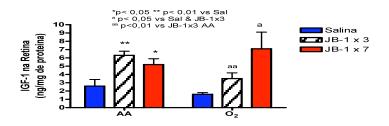


Gráfico 12- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de IGF-1 no fluido vítreo dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

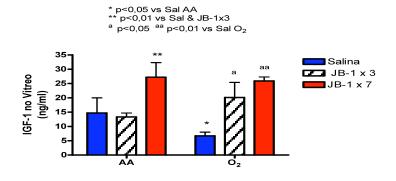


Gráfico 13- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de sVEGFR-1 na retina dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

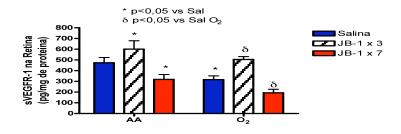


Gráfico 14- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de sVEGFR-1 no fluido vítreo dos ratos aos 14 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

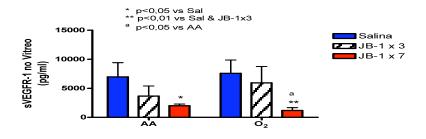


Gráfico 15- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de sVEGFR-1 na retina dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

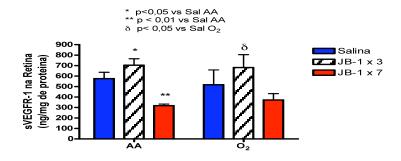


Gráfico 16- Efeito do ciclo de oxigênio nos níveis de sVEGFR-1 no fluido vítreo dos ratos aos 21 dias de vida nos diferentes grupos de tratamento

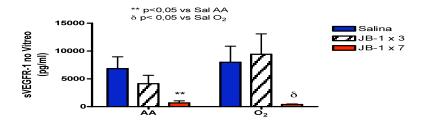
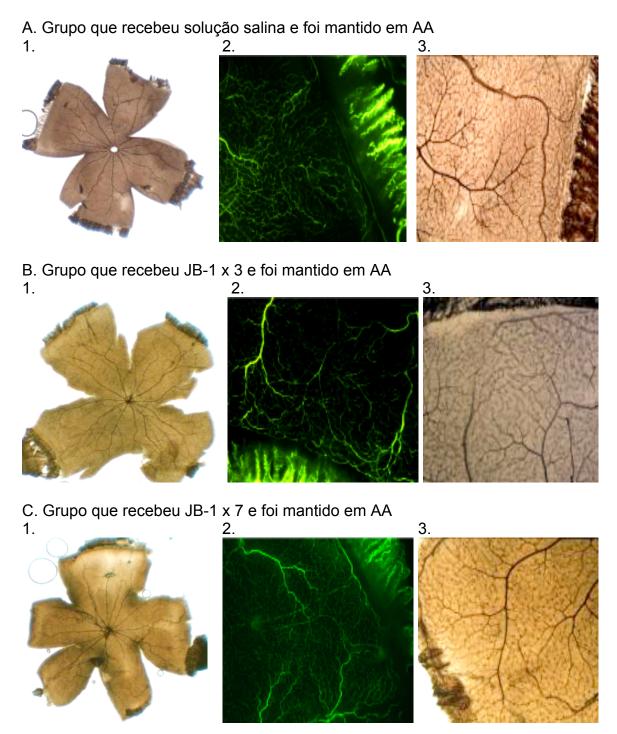


Figura 8- Fotos da retina dos grupos 14 dias em ar ambiente

A. Grupo que recebeu solução salina e foi mantido em AA. 1. B. Grupo que recebeu JB-1 x 3 e foi mantido em AA. 3. C. Grupo que recebeu JB-1 x 7 e foi mantido em AA 2.

Figuras da coluna 1 -retinas coradas pelo metodo de ADPase em aumento de 4x. Figuras da coluna 2 -retinas coradas pelo metodo de fluoresceina em aumento de 10x Figuras da coluna 3 -retinas coradas pelo metodo de ADPase em aumento de 10x

Figura 9- Fotos das retinas dos grupos 21 dias em ar ambiente



Figuras da coluna 1 -retinas coradas pelo metodo de ADPase em aumento de 4x. Figuras da coluna 2 -retinas coradas pelo metodo de fluoresceina em aumento de 10x Figuras da coluna 3 -retinas coradas pelo metodo de ADPase em aumento de 10x

Figura 10- Fotos das retinas dos grupos 14 dias sob ciclos de Hiperoxia/ Hipoxia

A.Grupo que recebeu solução salina e foi submetido aos ciclos de H/H 2. B. Grupo que recebeu JB-1 x 3 e submetido aos ciclos de H/H. C.Grupo que recebeu JB-1 x 7 e foi submetido aos ciclos de H/H.

Figuras da coluna 1 -retinas coradas pelo metodo de ADPase em aumento de 4x. Figuras da coluna 2 -retinas coradas pelo metodo de fluoresceina em aumento de 10x Figuras da coluna 3 -retinas coradas pelo metodo de ADPase em aumento de 10x

Figura 11- Fotos das retinas dos grupos 14 dias Hiperóxia/Hipóxia-7 dias ar ambiente

A. Grupo que rebeu solução salina e foi submetido a 14 DO₂ e 7 D AA. 2. B.Grupo que recebeu JB-1 x 3 e foi submetido a 14 DO₂ e 7 D AA. C. Grupo que rcebeu JB-1 x 7 $\,$ e foi submetido a 14 DO $_2$ e 7 D AA.

Figuras da coluna 1 -retinas coradas pelo metodo de ADPase em aumento de 4x. Figuras da coluna 2 -retinas coradas pelo metodo de fluoresceina em aumento de 10x Figuras da coluna 3 -retinas coradas pelo metodo de ADPase em aumento de 10x

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

O uso de modelos animais no estudo da retinopatia induzida por oxigênio permitiu o melhor entendimento de doenças caracterizadas por neovascularização patológica incluindo a retinopatia da prematuridade, e ainda são muito usados em estudos buscando a prevenção e controle da doença⁶³.

5.1 Justificativa do modelo experimental em ratos

O modelo experimental em ratos já foi validado morfometricamente, eletrofisiologicamente, bioquimicamente e imunohistoquimicamente para o estudo da retinopatia da prematuridade^{28,53,55,56,64-71}. Estudos de Penn e colaboradores^{64,65} em 1988 e 1989, demonstraram que o modelo experimental de retinopatia em ratos compartilha uma série de características semelhantes com a doença observada em humanos, e por isso é considerado um bom modelo animal, incluindo alterações como neovascularização pré-retiniana (definida como tufos ou conglomerados vasculares que se estendem da retina até o vítreo, muitas vezes com extravasamento sanguíneo), hemorragia

retiniana, "shunts" arteriovenosos e dobras retinianas ou descolamento. O rato recém-nascido apresenta ainda uma série de peculiaridades que o faz um bom modelo experimental para este estudo: 1) o desenvolvimento normal da retina do rato é semelhante ao dos humanos, 2) o rato recém- nascido mantido em ar ambiente após a hiperóxia mostra características de doença "plus", desenvolvimento vascular anormal, extravasamento sanguíneo, hemorragia vascular e tufos capilares, 3) o rato é um animal barato e de fácil manutenção, 4) como os humanos, a retina do rato recém-nascido é deficiente em vitamina E comparado com adultos e os vasos da retina se formam a partir de precursores mesenquimais, 5) como os humanos, o rato é o único animal de pequeno porte com uma artéria central da retina que se divide em ramificações que se estendem até a periferia⁵², 6) a indução da retinopatia no rato com variáveis frações de oxigênio produz oscilações nos níveis séricos de oxigênio semelhantes aos observados em humanos que desenvolvem a retinopatia ^{69,71}, 7) a vascularização normal da retina em ratos está completa aos 14 dias pósnatais, tornando-o um modelo viável para o estudo da retinopatia induzida por oxigênio 64-69.

5.2. Protocolo de oxigênioterapia para indução de retinopatia em ratos.

Estudos experimentais de RIO tradicionalmente envolvem a exposição dos ratos recém-nascidos a níveis constantes de hiperóxia 28,55,73. Isto ocorre devido à tentativa de simular a oferta de oxigênio a que estes RNs estão submetidos. Esta situação, no entanto, não reflete a condição fisiológica real do RN prematuro doente, que frequentemente sofre episódios de hipoxemia como consequência de apnéias, displasia broncopulmonar, aspiração traqueal e outras complicações respiratórias e metabólicas⁵⁵. Considerando-se que o rato recémnascido é saudável, a exposição à hipóxia ambiente é necessária para simular a hipóxia sistêmica sofrida pelos RNs humanos. Em nosso estudo, o modelo de exposição ao oxigênio utilizando-se de ciclos repetidos e sequenciais de hipóxia após período de hiperóxia foi considerado o mais próximo do que ocorre na prática clinica. Estudos prévios demonstraram que a exposição variável à hipóxia é mais efetiva que a hiperóxia constante na indução da retinopatia induzida por oxigênio em ratos RN⁷⁴⁻⁷⁷. McColm e colaboradores⁷⁶ em 2004, mostraram que as repetidas flutuações entre hipóxia e hiperóxia causam um substancial aumento na expressão de fatores de crescimento como VEGF-164, resultando em maior extensão de neovascularização retiniana. Estudos de Penn e colaboradores⁵⁵ em 1995 demonstraram que as flutuações de oxigênio e o

grau de hipóxia exercem mais influência na doença retiniana vascular proliferativa nos ratos que a hiperóxia continua por longo período, e constataram que a variação hiperóxia /hipóxia de 50% de oxigênio para 10% de oxigênio leva à retinopatia mais grave no modelo experimental de retinopatia induzida por oxigênio em ratos.

A eficácia da utilização do modelo de hiperóxia/hipóxia, representado pelo esquema de manter os ratos em 50% de oxigênio e submetê-los a três ciclos consecutivos de hipóxia a 12% foi previamente estudado pelo mesmo laboratório, e Colemann e colaboradores⁴⁶ em 2008, demostraram que no modelo de retinopatia induzida por oxigênio, os ciclos repetidos e consecutivos de hipóxia durante a hiperóxia foram responsáveis por maior comprometimento vascular retiniano, com a presença de tufos vasculares, hemorragia e neovascularização exuberante, quando comparados com ratos submetidos a ciclos de hipóxia a cada duas horas. Estes achados foram associados a um aumento de VEGF e diminuição de sVEGFR-1 e IGF-1 sistêmicos, validando assim o protocolo de administração de oxigênio utilizado em nosso estudo.

5.3. Efeitos do tratamento na avaliação antropométrica

O IGF apresenta importante papel na regulação de uma grande variedade de processos, incluindo proliferação e diferenciação celular e durante o período pós-natal, contribui largamente para o crescimento físico⁷⁸.

Procurando-se estabelecer a influência do uso de uma droga sistêmica que interfere com a ação do IGF-1, tivemos a preocupação de correlacionar os efeitos da droga na neovascularização retiniana com a avaliação do crescimento linear e peso corpóreo dos ratos.

O tratamento sistêmico com três doses precoces, pós-natais de JB-1 durante a hiperóxia resultou em supressão da retinopatia induzida por oxigênio em ratos sem efeitos indesejados nas medidas antropométricas no P14 e P21. No entanto, o tratamento prolongado com JB-1, demonstrou uma diminuição do peso corpóreo e no comprimento no P21 quando comparados ao grupo controle (solução salina) nos ratos expostos ao O₂.

O JB-1 é um análogo do IGF-1 que se liga aos seus receptores impedindo a ligação do próprio IGF-1. No entanto, ele não é seletivo aos receptores oculares, e portanto alguns efeitos sistêmicos são esperados^{49,51}. Contudo, o uso curto do JB-1 não demonstrou estes efeitos, o que pode sugerir

que esta exposição mais breve à droga pode não ser suficiente para causar inibição de crescimento, ou ainda indicar que a inibição possa ter ocorrido na fase inicial de exposição à droga, mas após a sua suspensão seguiu-se um rebote dos níveis de IGF-1, que foi acompanhado por uma recuperação do peso corporal e comprimento, explicando assim porque após o tratamento curto, os ratos apresentaram uma tendência a serem maiores que os ratos dos grupos de tratamento longo no 14° e 21° dias de vida.

5.4. Influência do tratamento nos fatores de crescimento

Os dados demonstraram que os níveis séricos de IGF-1 foram suprimidos nos grupos expostos ao O₂ em ambos os grupos de tratamento. Por outro lado, um padrão inverso foi observado em relação aos compartimentos oculares, sendo que os níveis de IGF-1 na retina e no vítreo estavam aumentados de maneira dose-dependente. Estes achados confirmam a teoria da diferença dos níveis de fatores de crescimento entre os meios séricos e oculares devido à barreira hemato-ocular⁷⁹.

O aumento dos níveis oculares de IGF-1 em resposta ao tratamento com JB-1 pode ser justificado pelo aumento a produção de IGF-1, pela ativação

da transcriptase do IGF-1 induzida pela hipóxia⁸⁰ ou este aumento pode ter ocorrido pela própria ligação do receptor de IGF-1 ao JB-1, impedindo a incorporação e o transporte do IGF-1, e resultando em seu acúmulo local. Sabendo-se que os níveis circulantes e locais do IGF-1R são extremamente dependentes dos níveis circulante de IGF-1, o aumento local do IGF-1 pode ter causado uma diminuição do número de seus receptores por "feedback" negativo, como resposta do aumento da oferta do fator ^{81,82}.

Estudos de Hellstrom e colaboradores⁸³ em 2002 sugerem que níveis sistêmicos baixos de IGF-1 em ratos influenciam negativamente o desenvolvimento normal da retina, mesmo na presença do VEGF, o que pode desencadear a neovascularização da retina 44,84. No nosso estudo, demonstrouse que o uso do inibidor do IGF-1 durante os três primeiros dias de vida aparentemente suprimiu por completo o desenvolvimento retiniano até o 14º dia de vida. No entanto, a exposição mais prolongada com JB-1x7 apresentou um comportamento oposto ao esperado nos níveis de IGF-1 no compartimento ocular, e mesmo assim não mostrou exacerbação da vascularização no 21º dia de vida. Estes achados sugerem que deva ocorrer um rebote dos níveis de IGF-1 após a exposição à droga JB-1. Este rebote pode ter sido responsável por uma proteção contra a lesão oxidativa e contribuído para a tolerância a hipóxia observada, como previamente descrito por Wang e colaboradores80 em 2004, ou ainda a retina inicialmente hipóxica pode ter engatilhado a ativação de outras

cascatas metabólicas (como a do fator indutor de hipóxia alfa), que proporciona proteção à agressão produzida pela hipóxia⁸⁰, justificando os achados retinianos observados no tratamento com JB-1x7. Neste contexto, o uso do tratamento curto com JB-1 (JB-1x3) se mostrou mais efetivo para a normalização dos níveis de IGF-1 na retina e na prevenção das alterações vasculares retinianas observadas nos ratos expostos aos ciclos de hiperóxia/ hipóxia.

Em relação aos níveis de VEGF observados no presente estudo, o aumento do VEGF em resposta à hipóxia seria uma conseqüência natural esperada, no entanto apesar do VEGF ser considerado como principal fator envolvido no desenvolvimento da retinopatia da prematuridade, demonstrou-se que o uso de um análogo do IGF-1 não interfere nos níveis de VEGF no sangue, retina e fluído vítreo, confirmando os achados de Smith e colaboradores⁵¹. Do mesmo modo, o JB-1 compete com o IGF-1 pela ligação com o receptor de IGF-1, agindo como potente e seletivo antagonista, impedindo sua auto-fosforilação, sem exercer nenhuma atividade no IGF-2 49-51.

Estudos prévios, como o de Smith e colaboradores⁵¹ em 1999, onde foi realizada a administração de um outro análogo do IGF-1 (o JB-3) após a exposição ao oxigênio, já haviam demonstrado presença de efeitos supressivos na retinopatia induzida por oxigênio. No entanto, postulamos que a melhor atuação desta droga seria exercida quando administrada durante a exposição ao oxigênio, pois conforme publicado por Colemann e colaboradores em 2008 ⁴⁸, a

cascata de eventos que resulta na retinopatia é desencadeada antes da fase em que os ratos retornam ao ar ambiente .

O Receptor -1 solúvel de VEGF (sVEGFR-1) consiste em uma variante do VEGFR-1. Ele inibe a ação do VEGF em humanos e ratos por ligação competitiva de alta afinidade impedindo a ligação do VEGF com seu receptor ou ligando-se a ele e inativando-o85. Os dados mostraram que o uso do JB-1 durante os 3 primeiros dias de vida levou a um aumento dos níveis séricos e retinianos do VEGFR-1 solúvel no P14 e P21. Este receptor tem sido associado à redução da neovascularização em retinopatias isquêmicas^{86,87}. Aiello e colaboradores⁸⁵ em 1995, demostraram que a injeção de um antagonista do receptor de VEGF reduziu a neovascularização retiniana em 50%, e estudo publicado por Rota e colaboradores⁸⁷ em 2004 não só confirmou, mas descreveu a presença de uma diminuição ainda mais importante da neovascularização retiniana em ratos expostos ao oxigênio com a injeção de VEGFR-1 solúvel em um modelo de retinopatia isquêmica. Portanto, o aumento dos níveis de sVEGFR-1 encontrado no presente estudo pode justificar o porquê da ausência de neovascularização observada no grupo de tratamento curto (JB-1x3), explicando seus benefícios oculares. Ao contrário, a redução dos níveis intraoculares de sVEGFR-1 presente no grupo JB-1x7 pode explicar a evidência de tortuosidades vasculares encontrada neste grupo. No entanto, os mecanismos que explicam a diferente resposta dos níveis de sVEGFR-1 em

relação aos dois esquemas de tratamento com o JB-1 ainda precisam ser elucidados

5.5. Genes relacionados à angiogênese

Dos genes que regulam positivamente a angiogênese, VEGFA, CSF3, FGF, LEP, PDGFB, TGFA, RUNX1 e SHH foram os mais afetados pelos ciclos de hiperóxia/ hipóxia e pelo tratamento com JB-1. Interessantemente, a expressão do RUNX1, um gene envolvido em remodelamento de matriz e proliferação^{88,} está diminuída nos grupos submetidos aos ciclos de H/H e nos grupos de tratamento com o JB-1 no P14, mantendo-se suprimida no P21 nos grupos submetidos aos ciclos de H/H mas não nos grupos que receberam tratamento com a droga.

Os efeitos dos genes que regulam negativamente a angiogênese apresentaram-se variáveis, mas a família da prolactina foi a mais afetada com os ciclos e o tratamento. A prolactina pode estar elevada na circulação e no compartimento ocular em pacientes com retinopatia da prematuridade. Os altos níveis de prolactina levam a um aumento de seu metabólito, o 16K-PRL, um fragmento que atua como importante inibidor da angiogênese e da proliferação de células endoteliais⁸⁹, contrabalançando a neovascularização e contribuindo

com a resolução espontânea da ROP. Conforme visto, esta representa mais uma evidência de que o tratamento longo com a droga JB-1 leva a uma maior expressão do gene da prolactina, indicando que o processo da retinopatia está em andamento.

Na família dos genes TIMP, o TIMP-2 foi o mais afetado pelo tratamento curto no 21º dia de vida. TIMP são inibidores endógenos específicos das metaloproteinases de matriz, endopeptidases intimamente envolvidas na proliferação celular, diferenciação e angiogênese⁹⁰. Este achado pode acrescentar informações a fim de se explicar a ausência de retinopatia induzida por oxigênio observada no grupo JB-1 x 3 e a presença de tortuosidade vascular no grupo JB-1 x 7.

Portanto, demonstrou-se que o uso sistêmico de JB-1 influencia os níveis intraoculares de IGF-1. A exposição curta se mostrou mais benéfica nos efeitos oculares que a exposição prolongada. O tratamento intermitente com sete doses em dias alternados resultou em alteração das medidas antropométricas no 21º dia e a maiores níveis de VEGF e IGF-1, associados a tortuosidades de vasos retinianos e neovascularização.

A duração da exposição ao JB1 se mostrou de extrema importância, considerando os efeitos no crescimento somático e a exposição prolongada pode resultar em futuro rebote do IGF-1, levando ao aumento dos seus níveis no compartimento ocular e desencadeamento da neovascularização. O mecanismo

que relaciona o JB-1 ao sVEGFR-1 ainda não foi determinado. No entanto, como já se demonstrou que o sVEGFR-1 age como um mediador de VEGF, reduzindo sua ação biológica, estudos futuros devem ser realizados para confirmar se o JB-1 deve ser usado em recém-nascidos prematuros na prevenção da retinopatia da prematuridade.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

No estudo realizado com o uso do JB-1 (um análogo do IGF-1) em um modelo experimental de retinopatia induzida por oxigênio em ratos submetidos a episódios curtos e sequenciais de hipóxia durante o período de hiperóxia, concluiu-se que:

- O uso de um análogo do IGF-1 não alterou significantemente os níveis de VEGF no sangue, na retina e no vítreo.
- Os níveis de VEGF, IGF-1 e s VEGFR-1 no sangue e no compartimento ocular não são relacionados.
- O uso curto de um análogo do IGF-1, durante os ciclos de hiperóxia/ hipóxia resulta em um rebote de IGF-1 e sVEGFR-1 aos 21 dias no compartimento ocular, que resultou na supressão da retinopatia induzida por oxigênio.

 O uso prolongado de um análogo de IGF-1 durante os ciclos de hiperóxia/ hipóxia resulta em um rebote de IGF-1 e supressão dos níveis de sVEGFR-1 aos 21 dias no compartimento ocular, o que pode contribuir com a angiogênese retiniana. 7. Considerações Finais

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Seguindo a recente correlação da importância e da influência do IGF-1 na retinopatia da prematuridade, agindo até como fator preditor da gravidade da doença, nosso estudo demonstrou que o uso de um análogo do IGF-1 suprimiu com sucesso a retinopatia induzida por oxigênio em ratos.

Esta constatação abre espaço para um novo campo de pesquisas relacionadas à prevenção ou tratamento da retinopatia da prematuridade, e estes resultados nos levam a questionar o exato papel dos IGF na formação vascular da retina, assim como nos estimulam a desvendar as inúmeras interações e os papéis que os receptores de IGF e suas proteínas de ligação exercem no mecanismo de ação do IGF.

Para fins práticos, o uso de uma droga que bloqueie o IGF-1 ainda necessita de maiores estudos, incluindo estudos clínicos, que investiguem qual é o melhor momento para se interferir, se na fase de obliteração dos vasos, ou na fase proliferativa, e qual a melhor maneira de se realizar esta interferência na prática médica diária, considerando que estes fatores de crescimento não agem somente no nível local do compartimento ocular, mas exercem função importante no desenvolvimento de outros órgãos e sistemas do recém-nascido prematuro, e assim, o uso de qualquer de drogas que possa atrapalhar este

desenvolvimento pode ser prejudicial.

De qualquer forma, este estudo parece abrir novas perspectivas na prevenção e controle, além de um novo horizonte visando terapias futuras relacionadas à modulação do IGF-1 no tratamento da retinopatia da prematuridade.

8. Referências bibliográficas

De acordo com:

Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed.

São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Smith LE Pathogenesis of retinopathy of prematurity. Semin Neonatol 2003;8:469-473.
- 2. Dobson V, Quinn GE. Retinopathy of prematurity. Optom Clin 1996; 5:105-124.
- 3. Reynolds JD. The management of retinopathy of prematurity. Pediatr Drugs 2001; 3:263-272.
- 4. Bossi E, Koerner F. Retinopathy of prematurity. Intensive Care Med 1995; 21:241-246.
- 5. Phelps DL. Retinopathy of prematurity. Pediatr Clin North Am 1993;40:705-714.
- Terry,TL. Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. I.Preliminary report, Am J Ophthalmol 1942;25:203-204.
- Owens WC, Owens EU. Retrolental fibroplasia in premature infants. Am J Ophthalmol 1949;32:1-29.
- 8. Owens WC, Owens EU. Retrolental Fibroplasia. Am J Public Health 1950;40:405-8.
- 9. Heath P. Pathology of retinopathy of prematurity: retrolental fibroplasia. Am J Ophthalmol 1951;34(9):1249-59.

- 10. Campbell K. Intensive oxygen therapy as a possible cause for retrolental fibroplasia. A Clinical approach. Med J Austr 1951;2:48-50.
- 11. Hatfield EM. Blindness in infants and young children. Sight Sav Rev 1972;42:69-89.
- 12. Clare G. Epidemiology in practice: an introduction. J Comm Eye Health 1997;10(21):8-10
- 13. Hussain N, Clive J, Bhandari V. Current incidence of retinopathy of prematurity,1989-1997. Pediatrics 1999;104 (3);e26.
- 14. The STOP-ROP Multicenter Study Group. Supplemental therapeutic oxygen for prethreshold retinopathy of prematurity (STOP-ROP), A randomized, controlled Trial I: Primary Outcomes. Pediatrics 2000; 105:295-31.
- 15. Gergely K, Gerinnec A. Retinopathy of Prematurity-epidemics, incidence, prevalence and blindness. Bratist Lek Listy 2010;111(9):514-17
- 16. Rogowsky J. Cost-effectiveness of care for very low birthweight infants. Pediatrics 1998; 102(1):35-43

- 17. Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Korones SB, Papile LA, Stoll BJ, Verter J, Temprosa M, Wright LL, Ehrenkranz RA, Fanaroff AA, Stark A, Carlo W, Tyson JE, Donovan EF, Shankaran S, Stevenson DK. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development. Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996, NICHD Neonatal Research Network. Pediatrics 2001; 107(1): e1.
- 18. Facts about retinopathy of prematurity Nat eye institute 2007. Disponível em http://www.nei.nih.gov/health/rop/rop.asp
- 19. Fortes filho JB, Eckert GU, Valiatti FB, da Costa MC, Bonomo PP, Procianoy RS. Prevalence of retinopathy of prematurity: an institutional cross-sectional study of preterm infants in Brazil. Rev Panam Salud Publica 2009;26(3):216-20.
- 20. Graziano RM, Leone CR, Cunha SL, Pinheiro AC. Prevalence of retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. J. Pediatr (Rio J)1997;73(6):377-382.
- 21. Shinsato RN, Paccola L, Gonçalves WA, barbosa JC, Martinez FE, Rodrigues M de L, Jorge R. Frequency of retinopathy of prematurity in newborns at the Clinical Hospital, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Arq Bras Oftalmol 2010;73(1):60-5.
- 22. Pinheiro AM, Silva WA, Bessa CG, Cunha HM, Ferreira MA, Gomes AH. Incidence and risk factors of retinopathy of prematurity in University Hospital Onofre Lopes, Natal (RN)- Brazil. Arq Bras Oftalmol 2009;72(4):451-6.

- 23. Abreu Caligaria LS, Medina NH, Durkin SR, Haro-Muñoz E, Chinen NH. Assessment of the current ocular health practices within neonatal units in the city of São Paulo, Brazil. Ophthalmic Epidemiol.2010;17(5):333-7.
- 24. Hughes S, Yang H,Chan-Lin T. Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. IOVS 2000.41(5):1217-28.
- 25. Madan S, Good WV. Disorder of the eye. In: WH Taeusch, RA Ballard, CA Gleason *Avery's disease of fetus and newborn.* 8a. ed Philadelphia Elsevier Saunders. 2005. p 1539-1555.
- 26. Barnett JM, yanni SE, Penn JS. The development of the rat model of retinopathy of prematurity. Doc Ophthalmol 2010.120:3-12.
- 27. Ashton N, Cook C. Direct observation of the effect of oxygen on developing vessels: a preliminary report. Br J Ophthtamol 1954.38:433-440.
- 28. Penn JS, Tolman BAL, Henry MM. Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci1994; 35:3429-35.
- 29. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989;246:1306-09.
- 30. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 1992.359:843-45.

- 31. Donahue ML, Phelps DL, Watkins RH, LoMonaco MB, Horowitz S. Retinal vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression is altered in relation to neovascularization in oxygen induced retinopathy. Current Eye Res 1996; 15:175-184.
- 32. Robbins SG, Rajaratnam VS, Penn JS. Evidence for upregulation and redistribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors Flt-1 and flk-1 in the oxygen injured rat retina. Growth Factors 1998; 16:1-9.
- 33. Robbins SG, Conaway JR, Ford BL, Roberto KA, Penn JS. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in vascular and non-vascular cells of the normal and oxygen-injured rat retina. Growth Factors 1997; 14:229-41.
- 34. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LEH. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF receptor chimeric proteins. Proc Natl Acad Sci 1995; 92:10457-10461.
- 35. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LEH. Vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 905-909.

- 36. Lashkari K, Hirose T, Yazdany J, McMeel JM, Kazlauskas A, Rahim Nader. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity. Am J Pathol 2000; 156:1337:1344.
- 37. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thiem H, Iwanoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, King GL. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. New Engl J Med 1994; 331:1480-1487.
- 38. Pierce EA, Foley ED, Smith LEH. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. Arch Ophthalmol 1996; 114:1219-1228.
- 39. Hellstrom A, Svensson E, Corlsson B, Niklasson A, Albertsson-Wikland K.. Reduced retinal vascularization in children with growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:795-798.
- 40. Underwood LE, D'Ercole. Insulin and insulin-like growth factors/somatomedins in fetal and neonatal development. Clin Endocrinol Metab.1984;13:69-84
- 41. Svensson E, Corlsson B, et al. Reduced retinal vascularization in children with growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab.1999;84:795-798.
- 42. Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, Foley E, Smith RG, Schaeffer JM.. Essential role of growth hormone in ischema-induced retinal neovascularization. Science 1997; 276:1706-9.

- 43. King GL, Goodman AD, Buzney S, Moses A, Kahn CR. Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulin-like growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. J Clin Invest 1985;75:1028-1036.
- 44. Hellstrom A, Perruzzi C, Ju M, Engstrom E, Hard AL, Liu JL, Albertsson-Wikland K, Carlsson B, Niklasson A, Sjodell L, LeRoith D, Senger DR, Smith LE. Low IGF-1 suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98:5804-5808.
- 45. Smith LEH. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. Acta Paediatr Suppl. 2002;91(437):26-8.
- 46. Brock RS, Beharry KD, Coleman RJ, Modanlou HD. Growth factors in the retina and lens during normal vascularization of the rat retina. In: Abstracts of the PAS 2007 Annual Meeting. May 3-8, 2007. Toronto, Canada. E-PAS2007:61: 6298.10.
- 47. Brock, RS, Beharry KD, Coleman RJ, Aranda JV, Modanlou HD. Effects of early postnatal Ibuprofen and Indomethacin on ocular VEGF, Soluble VEGF Receptor-1, and IGF-1 in a novel rat model for ROP. In: Abstracts of the PAS 2007 Annual Meeting. May 3-8, 2007. Toronto, Canada. E-PAS2007:61: 7165.7.

- 48. Coleman R, Beharry KD, Brock RS, Abad-Santos P, Abad-Santos M, Modanlou HD. Effects of brief, clustered versus dispersed hypoxic episodes on systemic and ocular growth factors in a rat model of Oxygen induced retinopathy. Pediatr Res 2008;64(1):50-5.
- 49. Pietrzkowski Z, Wernicke D, Porcu P, Jameson BA, Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by peptide analogues of insulin-like growth factor 1. Cancer Res 1992;52:6447-6451.
- 50. Pietrzkowski Z, Mulholland G, Cornella L, Jamerson BA, Wernicke D, Baserga R. Inhibition of growth of prostatic cancer cell lines by peptide analogues of insulin-like growth factor 1. Cancer Res 1993;53:1102-1106.
- 51. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, Robinson G, Driver S, Bischoff J, Zhang B, Schaeffer JM, Senger DR. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. Nature Med.1999;12(5):1390-1395.
- 52. Larrazaba LI, Penn JS. Fluorescein angiography of the newborn rat.

 Implications in oxygen-induced retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci
 1990;31:810-818.
- 53. Penn JS, Henry MM, Tolman BL. Exposure to alternating hypoxia and hyperoxia causes severe proliferative retinopathy in the newborn rat. Pediatr Res 1994; 36:724-31.

- 54. Mc Leod DS, Lutty GA, Wajer SD, Flower RW. Visualization of a developing vasculature. Microvasc Res. 1987;33:257-269.
- 55. Penn JS, Henry MM, Wall PT, Tolman BL. The range of PaO₂ variation determines the severity of oxygen-induced retinopathy in newborn rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995; 36 (10):2063-2070.
- 56. Penn JS, Tolman BL, Lowery LA. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993;34:576-585.
- 57. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step meyhod of RNA isolation by acid guanidiym thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal biochem 1987;162:156-159
- 58. Tumaga P, Beharry K, Akmal Y, Frederico C, Modanlou HD. Biochemical changes in prostanoids and cerebral expression of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 during morphine sulfate infusion in the newborn piglet. Prostaglandins & Other Lipid Met 1999;58:273-284.
- 59. Modanlou HD, Beharry K. Biochemical and molecular endothelin responses to morphine sulfate infusion in conscious newborn piglets. Can J Physiol Pharmacol 1998;76:443-450.
- 60. Modanlou HD, Gharraee Z, hasan J, Waltzman J, Nageotte S, Beharry KD.

 Ontogeny of VEGF, IGF-1 and GH in Neonatal rat serum, Vitreous fluid and retina from birth to weaning. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006:47:738-44.

- 61. Higgins RD, Yu K, Sanders RJ, Nandgaonkar BN, Rotschild T, Rifkin DB. Curr Eye Res 1999;18:20-27.
- 62. Zhang S, Leske DA, Holmes JM. Neovascularization grading methods in a rat model of retinopathy of prematurity. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41(3):887-891.
- 63. Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L. Animals models of choroidal and retinal neovascularization. Prog Retin Eye Res 2010;29:500-519.
- 64. Penn JS, Thum LA. Oxygen-induced retinopathy in the rat. Basic Life Sci 1988; 49:1025-1028.
- 65. Penn JS, Thum LA. The rat as an animal model for retinopathy of prematurity.

 Prog Clin Biol Res 1989;314:623-642.
- 66. Penn JS, Rajaratnam VS, Collier RJ, Clark AF. The effect of an angiostatic steroid on neovascularization in a rat model of retinopathy of prematurity. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:283-290.
- 67. Penn JS, Tolman BL, Bullard LE. Effect of a water-soluble vitamin E analog, trolox C, on retinal vascular development in an animal model of retinopathy of prematurity. Free Radical Biology & Medicine 1997; 22:977-984.
- 68. Penn JS, Johnson BD. Fluorescein angiography as a means of assessing retinal vascular pathology in oxygen-exposed newborn rats. Current Eye Res 1993; 12:561-570.

- 69. Penn JS, Tolman BL, Lowery LA, Koutz CA. Oxygen-induced retinopathy in the rat: hemorrhages and dysplasias may lead to retinal detachment. Current Eye Res 1992; 11:939-953.
- 70. Penn JS, Thum LA, Naash MI. Oxygen-induced retinopathy in the rat. Vitamins C and E as potential therapies. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992; 33:1836-1845.
- 71. Penn JS, Gay CA. Computerized digital image analysis of retinal vessel density: application to normoxic and hyperoxic rearing of the newborn rat. Exp Eye Res 1992; 54:329-336.
- 72. Phelps DL. Retinopathy of prematurity: History, classification, and pathophysiology. NeoReviews 2001;2:153-166.
- 73. Ricci B. effects of hyperbaric, normobaric and hypobaric supplementation on retinal vessels in newborn rats: A preliminary study. Exp Eye Res 1987;44:459-464.
- 74. Cunningham S, McColm JR, Wade J, Sedowofia K, McIntosh N, Fleck BW. A novel model of retinopathy of prematurity simulating preterm oxygen variability in the rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:4275-4280.
- 75. McColm JR, Cunningham S, Wade J, Sedowofia K, Gellen B, Sharma T, McIntosh N, Fleck BW. Hypoxic oxygen fluctuations produce less severe retinopathy than hyperoxic fluctuations in a rat model of retinopathy of prematurity. Pediatr Res 2004;5(1):107-113.

- 76. McColm JR, Geisen P, Hartnett E. VEGF isoforms and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia: Relevance to Clinical ROP. Mol Vis. 2004;10:512-520.
- 77. Werdich XQ, McCollum GW, Rajaratnam VS, Penn JS, Variable oxygen and retinal VEGF levels: correlation with incidence and severity of pathology in a rat model of oxygen-induced retinopathy. Exp Eye Res 2004;79:623-630.
- Ogilvy-Stuart AL, Hands SJ, Adcock CJ, Holly JM, Matthews DR, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Wilkinson AR, Dunger DB. Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-1), IGF-binding protein-1, growth hormone, and feeding in the newborn. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:3550-3557.
- 79. Modanlou HD, Gharrae Z, Hasan J, Waltzman J, Nageotte S, Beharry KD.

 Ontogeny of VEGF, IGF-1 and GH in neonatal rat serum, vitreous fluid and retina from birth to weaning. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:738-744
- 80. Wang X, Deng J, Boyle DW, Zhong J, Lee WH. Potential role of IGF-1 in hypoxia tolerance using a rat hypoxic-ischemic model: activation of hypoxia-inducible factor 1α. Pediatr Res 2004;55:385-394.
- 81. Le Roith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. Endocr Rev 1995;16:143-163.

- 82. Robbins SG, Rajaratnam VS, Penn JS. Evidence for upregulation and redistribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors flt-1 and flk-1 in the oxygen injured rat retina. Growth Factors 1998; 16:1-9.
- 83. Hellstrom A, Carlsson B, Niklasson A, Segnestam K, Boguszewski M, de Lacerda L, Savage M, Svensson E, Smith L, Wienberger D, Albertsson-Wikland K, Laron Z. IGF-1 is critical for normal vascularization of the human retina. J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87:3413-3416.
- 84. Hellstrom A, Engstrom E, Hard AL, Albertsson-Wikland K, Carlsson B, Nikklasson A, Lovqvist C, Svensson E, Holm S, Ewald U, Holmstrom G, Smith LE. Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth. Pediatrics 2003;112:1016-20.
- 85. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF receptor chimeric proteins. Proc Natl Acad Sci 1995; 92:10457-10461.
- 86. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. FEBS Lett 2006;580 (12):2879-2887.

- 87. Rota R, Riccini T, Zaccarini M, Lamartina S, Del Gallo A, Fusco A, Kovesdi I, Balestrazzi E, Abeni D, Ali RR, Capogrossi MC. Marked inhibition of retinal neovascularization in rats following soluble-flt-1 gene transfer. J Gene Med 2004;6:992-1002.
- 88. Iwatsuki K, Tanaka K, kaneko T, Kazama R, Okamoto S, Nakayama Y, Ito Y, Satake M, Takahashi S, Miyajimas A, Watanabe T, Hara T. RunX-1 promotes angiogenesis by downregulation of insulin-growth factor-binding protein-3. Oncogenese 2005;24:1129-1137.
- 89. Nguyen N, Tabruyn SP, Lins L, Lion M, Cornet AM, Iair F, Rentiere-Deirue F, Brasseur R, Martial JA, Struman I. Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis. PNAS 2006;103(39):14319-14324.
- 90. Stetler-Stevenson WG, Seo D. TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. Trends in Mol Med 2005;11(3):97-103.