LUIZ FELIPE DE MORAES BARROS

Efeito da aplicação subconjuntival de Bevacizumab (Avastin®) na angiogênese e na atividade de metaloproteinases em córnea de ratos

São Paulo

2006

LUIZ FELIPE DE MORAES BARROS

**Efeito da aplicação subconjuntival de Bevacizumab (Avastin®) na
angiogênese e na atividade de metaloproteinases em córnea de ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica
Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Rubens Belfort Jr.

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Elza
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
9/11/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1766
FMVZ

Barros, Luiz Felipe de Moraes

Efeito da aplicação subconjuntival de Bevacizumab (Avastin®) na angiogênese e na atividade de metaloproteinases em córnea de ratos / Luiz Felipe de Moraes Barros. – São Paulo: L. F. M. Barros, 2006.
70 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Belfort Jr.

1. Bevacizumab. 2. Avastin. 3. Córnea. 4. Angiogênese.
5. Metaloproteinases. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

PARECER

Interessado: Luiz Felipe de Moraes Barros

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto protocolado sob o número 989/2006, intitulado: "Influência da aplicação de Bevacizumab na córnea de ratos", no qual foram utilizados 68 (sessenta e oito) ratos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 27 de outubro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BARROS, Luiz Felipe de Moraes

Título: Efeito da aplicação subconjuntival de Bevacizumab (Avastin®) na angiogênese e na atividade de metaloproteinases em córnea de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À Leda, minha esposa, que com muito amor e cumplicidade me dá forças nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Silvia e Paulo que são meus exemplos de família e de profissionais no quais vou me espelhar pra o resto de vida.

Aos meus avós, que dedicaram suas vidas aos filhos e netos e minha irmã, Maria Silvia, sempre carinhosa e afetuosa.

A meus sogros, Silvia e Roberto, que me receberam com um filho nesta minha nova família.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Rubens Belfort Jr. pela orientação e idealização do trabalho.

À professora Maria Lúcia Zaidan Dagli por disponibilizar toda estrutura necessária para análise das imagens.

Ao Dr. Acácio pelo incentivo ao trabalho e por fornecer o Avastin.

Ao professor Fernando Ferreira pelo auxílio com a análise estatística dos dados.

À Carolina por me ensinar a execução e processamento do material para angiogênese e ao Lucas pela ajuda com a análise das imagens.

À Cristina, Tânia, Vanessa, Carla e Denise do Laboratório de Patologia do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP pelo processamento do material para metaloproteinases.

A Angélica pelos ensinamentos transmitidos, fundamentais para minha iniciação na oftalmologia veterinária.

Ao César Freire pela amizade e ajuda nos protocolos anestésicos.

Aos amigos do serviço de oftalmologia pelo convívio sempre harmonioso e prazeroso.

Aos veterinários e pós-graduandos do serviço de cirurgia e anestesiologia pelo convívio sempre amistoso.

Ao Ney pela colaboração e paciência.

Aos enfermeiros Miron, Otávio, Jesus, Lélis, Milton, Gilberto e Carlito pela ajuda com os animais e outras inúmeras ajudas prestadas.

Às bibliotecárias em especial à Elza pela ajuda na formatação da tese.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia que me deu condições para realização deste trabalho e para minha formação profissional.

À CAPES pelo suporte financeiro durante os dois anos de mestrado.

A todos os animais que doaram suas vidas pela realização deste trabalho, meus sinceros agradecimento e respeito.

A todas as outras pessoas que me apoiaram e incentivaram para a concretização deste trabalho.

RESUMO

BARROS, L. F. M. **Efeito da aplicação subconjuntival de Bevacizumab (Avastin®) na angiogênese e na atividade de metaloproteinases em córnea de ratos** [The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin®) on angiogenesis and metalloproteinases activities in the rat cornea.]. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da aplicação de bevacizumab (Avastin®) sobre a angiogênese corneal. Para tanto ratos Wistar, machos, com idade entre 8 e 10 semanas, pesando 300 a 350g, foram submetidos a cauterização química com nitrato de prata por 10 segundos. Após realização da lesão, cada grupo de 5 animais foi tratado com injeções subconjuntivais de 0,02 ml de bevacizumab (Avastin®) pela via subconjuntival no momento da lesão, no 3° e 5° dia e submetidos à eutanásia ao 7° dia após cauterização corneal. A rede vascular neoformada foi quantificada após preenchimento do leito vascular com Tinta da China e análise das imagens em sistema computadorizado (Image Pro-Plus®). Para a segunda etapa do experimento, avaliou-se a atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 utilizando-se do mesmo modelo de angiogênese e dos mesmos tempos de tratamento. Transcorridos 7 dias de lesão corneal os animais foram eutanasiados e suas córneas submetidas a zimografia. Os resultados mostraram haver uma inibição da angiogênese quando se compara o grupo controle aos grupos tratados nos diferentes períodos de tempo. Quando a densidade vascular é comparada entre os tempos de aplicação, não se observa diferença estatisticamente significativa. Estes resultados em conjunto indicam que o tempo de aplicação não influencia a inibição da angiogênese e que o bevacizumab foi eficiente na redução da formação de vasos quando se compara a densidade vascular do grupo controle. O modelo experimental produziu considerável aumento das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9. Houve uma tendência a diminuição da atividade das MMPs quando bevacizumab foi aplicado no momento da lesão e quando foi aplicado ao 3° dia após cauterização. A atividade das MMPs mostrou-se aumentada quando o tratamento foi realizado no 5° dia. Desta forma pode-se concluir que o bevacizumab foi capaz de inibir a angiogênese corneal, independentemente do período de tratamento e ainda

que houve uma tendência a redução da atividade das MMPs carecendo, por enquanto, de mais investigações que possam elucidar a interação deste fármaco com a inibição de sua atividade.

Palavras-chave: Bevacizumab. Avastin. Córnea. Angiogênese. Metaloproteinases.

ABSTRACT

BARROS, L. F. M. **The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin®) on angiogenesis and metalloproteinases activities in the rat cornea** [Efeito da aplicação subconjuntival de Bevacizumab (Avastin®) na angiogênese e na atividade de metaloproteinases em córnea de ratos]. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The purpose of this study was to evaluate the effects of the use of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin®) on angiogenesis and metalloproteinases activities in the rat cornea after cauterization. Wistar male rats, aging 8 to 10 weeks, were used. The animals were divided in four groups: control group (GC) that received subconjunctivally 0,02 ml of 0,9% saline solution; group GO that received subconjunctivally 0,02 ml of bevacizumab just after the lesion; group G3 that received bevacizumab at day 3 after lesion and G5 that received bevacizumab at day 5 after lesion. The animals were euthanized at day 7 after lesion. The new formed vessels were quantified after the China Ink perfusion and photographs were obtained and analyzed in computadorized system (Image Pro-Plus®). The activities of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 were evaluated by zimography in a pool of corneas obtained from animals submitted to the same model and treatment schedule. The results showed an inhibition of angiogenesis when the control group were compared with all treated groups. There were no statistic differences when vascular density was compared between the treated groups. These results may indicate that bevacizumab was able to inhibit corneal angiogenesis and that there was no influence of the injection day. This angiogenesis model promoted an increase of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 activity. Zymography also showed a slight reduction in matrix metalloproteinases activity when bevacizumab were administrated at the injury moment and most significant at day 3. At day 5 zymography showed an increase of the activity of these metalloproteinases. Together these results may indicate that the subconjunctival injection of bevacizumab may have a therapeutic potential as an antiangiogenic agent and that matrix metalloproteinases activity decreased, but not at significant levels, demanding more

investigations regarding to the interaction of bevacizumab and activity of matrix metalloproteinases.

Key words: Bevacizumab. Avastin. Cornea. Angiogenesis. Matrix Metalloproteinases.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Angiogênese Corneal	15
2.1.1	Citocinas e Angiogênese	16
2.1.1.1	<i>Fator de Crescimento Tumoral (TNF)</i>	16
2.1.1.2	<i>Fator Transformador de Crescimento beta (TGF- β)</i>	17
2.1.1.3	<i>Interferon γ (INF- γ)</i>	17
2.1.1.4	<i>Interleucinas</i>	17
2.1.1.5	<i>Fator Básico de Crescimento Fibroblástico (bFGF)</i>	18
2.1.1.6	<i>Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I)</i>	18
2.1.1.7	<i>Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)</i>	18
2.1.1.8	<i>Fator Transformador de Crescimento Alfa (TGF- α)</i>	19
2.1.1.9	<i>Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF)</i>	19
2.1.1.10	<i>Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)</i>	19
2.2	VEGFs e Processos Mórbidos	22
2.3	Matriz Extracelular e Angiogênese	25
2.4	Modelos de Angiogênese	26
2.5	Terapia Anti-Angiogênica	30
3	OBJETIVO	35
4	MATERIAL E MÉTODO	36
4.1	Avaliação da Angiogênese	36
4.1.1	Grupos Experimentais	36
4.1.2	Anestesia	37
4.1.3	Cauterização da Córnea	37

4.1.4	Analgesia	37
4.1.5	Eutanásia	38
4.1.6	Preenchimento do Leito Vascular.....	38
4.1.7	Desidratação e Diafanização Corneal (Método de Spaltholtz)	38
4.1.8	Análise das Imagens	39
4.1.9	Análise Estatística	39
4.2	Atividade de metaloproteinases	40
4.2.1	Grupos Experimentais.....	40
4.2.2	Anestesia	40
4.2.3	Cauterização da Córnea	41
4.2.4	Analgesia	41
4.2.5	Eutanásia	41
4.2.6	Zimografia	41
4.2.7	Análise Estatística	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Avaliação da Angiogênese	43
5.2	Análise da Atividade de Metataloproteinases	53
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A neovascularização tem, há muito tempo despertado interesse na oftalmologia tanto humana quanto veterinária. A ênfase nas pesquisas, no entanto, tem sido muito mais em relação a neovascularização retiniana e subretiniana, muito provavelmente pela importância clínica que doenças como retinopatia diabética ou maculopatia relacionada à idade tem na sociedade. Ainda assim a angiogênese corneal bem como técnicas que possam impedir a progressão exacerbada de novos vasos devem ser estudadas uma vez que afecções que provoquem neovascularização corneal podem resultar em diminuição da acuidade visual. Apesar da angiogênese ter grande importância em processos fisiológicos como na cicatrização ou embriogênese ela está implicada em algumas afecções tais como artrites reumatóides e crescimento de metástases tumorais. Na oftalmologia, tem sido considerado um dos motivos pela falência ou fracasso de transplantes de membranas, de córnea ou até mesmo pós-cirurgias refrativas.

Muitos fatores de crescimento estão envolvidos nas diversas etapas da neovascularização, dentre eles o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular é considerado um dos que mais exercem influência sobre as células do endotélio vascular. Atualmente um grande contingente de pesquisadores tem concentrado seus esforços no desenvolvimento de estratégias que possam inibir a atividade do Fator de Crescimento de Endotélio Vascular e indiretamente inibir o processo de angiogênese. Alguns fármacos foram desenvolvidos com esta finalidade e a eficácia já foi comprovada no tratamento de afecções da retina, mais especificamente a maculopatia relacionada à idade e a retinopatia diabética entre outras.

Além dos fatores de crescimento, as metaloproteinases, enzimas capazes de degradar seletivamente matriz extracelular, são fundamentais na angiogênese por permitirem a progressão dos vasos formados em direção ao estímulo angiogênico promovido por uma determinada lesão.

Parece existir relação ainda não muito clara e definida entre metaloproteinases e Fator de Crescimento de Endotélio Vascular. Este último pode estimular a secreção de uma variedade de metaloproteinases e alguns trabalhos indicam que a inibição deste fator de crescimento pode diminuir a atividade de algumas metaloproteinases em tumores.

Os excelentes resultados que a aplicação de Bevacizumab na oftalmologia tem demonstrado nos permite pensar que esta seja uma importante arma terapêutica na inibição da angiogênese corneal, uma vez que o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular está intimamente relacionado o processo de neovascularização ocular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi dividida em alguns tópicos relevantes, descritos a seguir:

2.1 Angiogênese Corneal

Angiogênese pode ser definida como um processo de geração de novos vasos sangüíneos a partir de uma rede vascular pré-existente. Este processo tem fundamental importância em eventos fisiológicos tais como embriogênese, funções reprodutivas e cicatrizações. Também está implicado em afecções como maculopatia relacionada à idade, retinopatia diabética, artrites reumatóides e crescimento e metástases tumorais, daí a importância de se conhecer os eventos que compõe a angiogênese (SALESI et al., 2005).

De acordo com Folkman e Shing (1992) o processo de angiogênese, pode ser dividido em quatro etapas: degradação de matriz extracelular adjacente, migração, proliferação e alinhamento das células endoteliais para formação do tubo capilar. Desta forma, inicialmente os vasos mãe se dilatam, vasos estes que fornecem células endoteliais para formação dos brotos capilares. Em seguida, células endoteliais penetram a membrana basal e por meio de liberação de enzimas proteolíticas, degradam matriz extracelular. Isto permite a migração destas células guiadas por um gradiente quimiotático, rumo à origem do estímulo angiogênico. As células endoteliais passam a se multiplicar e alinhando-se formando tubos capilares.

Segundo Auerbach et al. (1994), uma seqüência de eventos se desencadeia para resultar em neovascularização iniciando-se pela *descontinuidade da estabilização vascular*. Neste primeiro estágio enzimas secretadas por macrófagos servem como maior estímulo para a descontinuidade da membrana basal do endotélio vascular. A destruição celular local e a retração endotelial contribuem para alterar a permeabilidade da membrana basal iniciando a angiogênese. O segundo estágio caracteriza-se pela *migração de células endoteliais em direção ao estímulo*, guiada pelo princípio da quimiotaxia. A migração acontece em resposta a fatores quimioatrativos locais ou sistêmicos, induzidos por fatores indutores de motilidade como as prostaglandinas. No

terceiro estágio ocorre a *proliferação celular endotelial* em que fatores de crescimento representam papel importante. O Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF), as Interleucinas (ILs), os Fatores Transformadores do Crescimento (TGFs) e o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) são alguns dos envolvidos na proliferação endotelial. Basicamente, estes fatores quando ligados ao receptor de superfície celular sinalizam o início da transcrição nuclear. No quarto estágio ocorre a *organização tridimensional das células para a formação de neovasos*. A polaridade intrínseca de cada célula forma uma alça capilar que, em função da habilidade das células em formar junções intercelulares, pode ser estendida num arranjo multicelular para a formação de um tubo capilar. Finalizando os estágios da angiogênese ocorre a *germinação* que pode ser explicada por uma arborização dos vasos neoformados que se auto-limita quando o estímulo angiogênico termina.

2.1.1 Citocinas e Angiogênese

Citocinas são moléculas produzidas por uma variedade de leucócitos ou células teciduais como macrófagos e fibroblastos em consequência a uma lesão tecidual, iniciando a angiogênese (FORRESTER et al., 2002).

Estas moléculas têm efeito local em baixas concentrações, mas podem atuar a distância se forem liberadas na circulação sanguínea em concentrações suficientes.

As citocinas se dividem em algumas subclasses descritas a seguir.

2.1.1.1 Fator de Crescimento Tumoral (TNF)

Citocina pro-inflamatória que pode induzir inflamação intra-ocular e entre outras respostas celulares a ativação de leucócitos polimorfonucleares (PMN), indução de antígenos de histocompatibilidade maior (MHC), expressão de adesão molecular ou ainda secreção do Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF) por neutrófilos. Duas formas são descritas: TNF- α e TNF- β .

2.1.1.2 Fator Transformador de Crescimento beta (TGF- β)

Considerada uma importante citocina imunossupressora (CHEN; WAHL, 1999) que estimula o funcionamento de monócitos e a proliferação de linfócitos “T” *in vitro* (MCCARTNEY; WAHL, 1994) e *in vivo* (WAHL, 1994). Dentre os 6 existentes o TGF- β 2 é o subtipo mais encontrado no olho e estimula a síntese de colágeno e proliferação fibroblástica estromal desempenhando desta forma papel importante na cicatrização do estroma corneal.

2.1.1.3 Interferon γ (INF- γ)

Também uma citocina proinflamatória, mas com ação antiviral importante. Promove imunidade via apresentação de antígeno uma vez que induz MHC e outros antígenos de superfície. Na retina induz MHC tipo II (FORRESTER et al., 2002). Ainda são ativadores de macrófagos, importantes na angiogênese, uma vez que tem atividade secretora de fatores angiogênicos (POLVERINI et al., 1977).

2.1.1.4 Interleucinas

Consideradas uma subclasse das citocinas agem em vários tipos celulares inclusive sobre leucócitos. A Interleucina-1 (IL-1) ativa leucócitos, monócitos e células endoteliais, também sintetizando prostaglandinas. Desta forma, no bulbo ocular está envolvida em algumas formas de uveítes. A Interleucina-2 (IL-2) está envolvida na resposta mediada por células T “helpers” 1 e 2 e ainda na ativação de células “natural killer” (NK). A Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina proinflamatória produzida por vários tecidos incluindo o epitélio pigmentário da retina (RPE). O RPE ainda pode secretar Interleucina-8 (IL-8) assim como o endotélio corneal e as células estromais. A Interleucina-10 (IL-10) é predominantemente imunossupressora diminuindo a expressão

de MHC tipo II. Finalmente as Interleucinas -12 e 15 (IL-12 e IL-15), promovem atividade proinflamatória das células T e NK.

2.1.1.5 Fator Básico de Crescimento Fibroblástico (bFGF)

Trata-se de um potente mitógeno para células da musculatura lisa vascular e células endoteliais, porém só induz neovascularização corneal se estiver acompanhado de invasão leucocitária (KINIGHTON et al., 1990).

Kenyon et al. (1996), demonstraram que a neovascularização induzida pelo bFGF inicia-se no terceiro dia e se mantém até o oitavo dia. Folkman et al. (1988), demonstraram que grande quantidade de bFGF está presente na membrana basal de córneas bovinas saudáveis. Estudos subseqüentes levaram ao isolamento deste fator de crescimento no filme lacrimal, no humor vítreo de portadores de diabetes e em membranas neovasculares de retina e coróide (CASEY; LI, 1997).

2.1.1.6 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I)

Sintetizado principalmente no fígado, quando presente em altas concentrações séricas, une-se a receptores específicos em células endoteliais da retina e aumenta a síntese de DNA como demonstrado em experimento realizado *in vitro* por King et al. (1985).

2.1.1.7 Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)

Um dos fatores mais estudados na cicatrização corneal, uma vez que estimula a mitose do epitélio corneal e dos fibroblastos estromais, aumentando a síntese de DNA e RNA. Estudos mostram sua eficácia no tratamento de úlceras indolentes (SWANK; HOSGOOD, 1996).

2.1.1.8 Fator Transformador de Crescimento Alfa (TGF- α)

Esta citocina é secretada por macrófagos e ceratócitos. Presente no filme lacrimal e humor aquoso atua nas células epiteliais e endoteliais. Em experimento realizado por Schultz et al. (1994), ratos com deficiência de TGF- α apresentaram malformações oculares em diferentes graus de severidade, o que leva a crer que trata-se de substância importante para o desenvolvimento ocular. Assim como o TGF- α , o TGF- β é uma citocina quimioatrativa para macrófagos e também está presente em tecidos oculares. Pelo menos duas isoformas de TGF- β já foram encontradas em câmara anterior de humanos (CASEY; LI, 1997).

2.1.1.9 Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF)

Plaquetas presentes na área lesada, macrófagos, células da musculatura lisa e células endoteliais vasculares são secretores deste fator. Pode estar envolvido na cicatrização corneal, pois *in vitro* estimula a síntese de fibronectina, ácido hialurônico, colagenase e outras substâncias que são atuantes no processo de reparação corneal (SWAK; HOSGOOD, 1996).

2.1.1.10 Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)

O VEGF é um dos fatores proangiogênicos mais bem caracterizados. Trata-se de importante estimulador de proliferação e migração de células endoteliais assim como de formação do tubo vascular *in vitro*, processos fundamentais da angiogênese. Durante o desenvolvimento, as células endoteliais são completamente dependentes do VEGF para sobrevivência, ao passo que no adulto sua presença não é tão vital. Isto pôde ser comprovado por Gerber et al. (1999) quando mostraram que a inibição de VEGF provocou alterações apoptóticas extensas em vasos sanguíneos de camundongos neonatos, mas não tão importantes em animais adultos. Estudos apontaram também

que o uso de anticorpos anti-VEGF, levaram a desenvolvimento anormal de glomérulos renais em neonatos (KITAMOTO; TOKUNAGA, 1997). O VEGF também desempenha papel importante em processos fisiológicos em angiogênese em ovário e útero (CAMPOCHIARRO et al., 2006). Em processos mórbidos neovascularizantes, tais como formações tumorais, artrite reumatóide, neovascularizações coroidais ou retinianas entre outras, o VEGF também desempenha função importante (FERRARA et al., 2003). Nagy et al. (2002) demonstraram que o VEGF é capaz de induzir importante linfangiogênese em camundongos.

Apesar do VEGF ter como alvo principal células endoteliais, alguns estudos mostraram que ele também pode apresentar efeito mitogênico para diferentes tipos celulares como, por exemplo, servir como estimulador de células alveolares do tipo II produtoras de substância surfactante (COMPERNOLLE et al., 2002).

Roy et al. (2006) dividem a família do VEGF em sete membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e o fator de crescimento placentário (PIGF). Cada um deles apresenta atividades físicas e biológicas diferentes e atuam por meio de receptores tirosina quinase específicos (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3).

Os receptores para VEGF foram inicialmente identificados na superfície de vasos presentes na matriz extracelular, no entanto mais tarde observou-se a ocorrência destes receptores em células derivadas da medula óssea (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). O VEGF-A parece ser a molécula chave no processo de vasculogênese causando proliferação, brotamento, migração e formação de tubo (FERRARA et al., 2003). Sua ação é mediada primariamente pela ativação dos receptores VEGFR-1, VEGFR-2 e sua expressão demasiada promove respostas angiogênicas pronunciadas em vários tecidos. O VEGF-A pode contribuir para sobrevivência das células endoteliais na matriz extracelular na medida em que controla o extravasamento de fluido e proteínas plasmáticas, incluindo fibrina (KROLL; WALTENBERGER, 1999). A sobrevivência das células endoteliais ainda pode ser garantida pela liberação mediada pelo VEGF-A de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e A1.

Os primeiros estudos tinham como foco a influência deste fator nas células endoteliais, no entanto, estudos recentes descrevem a ação do VEGF-A em outras células como atividade mitótica tanto no epitélio pigmentário da retina bem como nas células de Schwann (ROY et al., 2006).

Algumas isoformas do VEGF-A são conhecidas tais como, VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉, VEGF-A₂₀₆, sendo o VEGF-A₁₆₅ a forma mais predominante. Enquanto

o VEGF-A₁₂₁ é uma proteína que circula livremente, o VEGF-A₁₈₉ e o VEGF-A₂₀₆ estão mais confinados à matriz extracelular (FERRARA et al., 2003).

A expressão do VEGF-A₁₆₅ e seu principal receptor VEGFR-2 foi estudada por Gan et al. (2004), em coelhos submetidos à lesão corneal por álcali. Estes autores observaram por método de imunohistoquímica uma forte expressão destas moléculas no epitélio, estroma e endotélio adjacentes durante a cicatrização da córnea, porém apenas na presença de granulócitos.

O VEGF-B expresso sob duas isoformas em humanos, o VEGF-B₁₆₇ e o VEGF-B₁₈₆. A primeira é encontrada na maioria dos tecidos, principalmente músculo esquelético e miocárdio e representa cerca de 80% da transcrição total de VEGF-B. Já o VEGF-B₁₈₆ é expresso em baixas concentrações em uma pequena variedade de tecidos. O papel deste fator de crescimento ainda é pouco conhecido. Estudos provocando deficiência deste fator em camundongos mostraram o desenvolvimento de um coração de menor tamanho, sugerindo que a formação das coronárias pode estar parcialmente ligada ao VEGF-B (BELLOMO et al., 2000).

O VEGF-C é um mitógeno indutor de migração e manutenção de células endoteliais. Em adultos, é expresso em diversos órgãos como coração, intestino delgado, placenta, ovários e tireóide e têm alta afinidade pelos receptores VEGFR-2 e VEGFR-3. Este fator de crescimento pode ser um importante fator de linfangiogênese que se desencadeia pela ligação com VEGFR-3 (ENHOLM et al., 2004).

O VEGF-D é uma glicoproteína que apresenta 48% de semelhança estrutural com o VEGF-C. É encontrado em órgãos de indivíduos adultos tais como coração, musculatura esquelética, pulmão e endotélio vascular. Atribui-se a este fator a proliferação celular endotelial e à semelhança do VEGF-C apresenta potencial linfangiogênico (ROY et al., 2006).

O VEGF-E liga-se especificamente ao VEGFR-2 e tem capacidade de estimular mitose e permeabilidade de células endoteliais (ROY et al., 2006).

O VEGF-F foi recentemente isolado do veneno de cobras e apresenta 50% da sua estrutura primária semelhante ao VEGF-A₁₆₅, também se ligando seletivamente ao VEGFR-2 (SUTO et al., 2005).

O Fator de crescimento plaquetário (PIGF), um membro da família dos VEGFs, foi primeiramente identificado em placentas. Atualmente sabe-se que o PIGF pode estar presente no coração e nos pulmões. À semelhança dos VEGFs também apresenta isoformas. Quatro são descritas: PIGF-1, PIGF-2, PIGF-3 e PIGF-4. Alguns mecanismos

pelos quais os PIGFs podem intensificar angiogênese incluem: transdução de sinal intracelular de transdução por receptores de VEGFR, aumento da fração de VEGF-A disponível para ativar VEGFR-2 e formação de um heterodímero de PIGF/VEGF-A que poderia atuar por meio de receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 (AUTERIO et al., 2003).

2.2 VEGFs e Processos Mórbidos

A revascularização de um tecido lesado é parte necessária e fundamental de qualquer processo cicatricial. Uma rede vascular insuficiente torna a cicatrização lenta e anormal. Muitos fatores de crescimento têm influência na cicatrização, mas o VEGF desempenha papel importante na medida em que garante que novos vasos se formem para conferir uma cicatrização mais harmoniosa.

A cicatrização normal é uma seqüência de eventos celulares altamente organizados: fagocitose, quimiotaxia, mitogênese, síntese de colágeno e de outros componentes da matriz (BATES; JONES, 2003). Tipos celulares específicos estão envolvidos em tempos preestabelecidos tais como plaquetas, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e por fim vasos sanguíneos. O VEGF pode ter ligação com cada elemento citado nas fases da cicatrização.

No momento da lesão tecidual, plaquetas e monócitos liberam VEGF quando ativados. A homeostase promovida pela coagulação dá base para a arquitetura observada na cicatrização. Coágulos de fibrina, por exemplo, dão suporte para migração celular. As plaquetas aprendidas neste coágulo são importantes não apenas para a homeostase, mas também para o processo inflamatório que se segue (BATES; JONES, 2003). Grânulos Alpha das plaquetas liberam VEGF, PDGF, TGF- β que por sua vez atraem macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Ainda o processo de coagulação reduz o fluxo sanguíneo resultando em hipóxia e aumento dos níveis de VEGF.

A reação inflamatória inerente à cicatrização também é marcada pela presença de VEGF. Os pontos cardeais da inflamação -dor, rubor, calor- refletem um aumento da permeabilidade vascular secundário ao acúmulo de substâncias vasoativas em especial o VEGF (BATES; JONES, 2003). Na inflamação tardia, caracterizada pela presença de macrófagos responsáveis por fagocitose e produção de alguns fatores de crescimento

necessários à formação de matriz extracelular, particularmente existe elevada expressão de mRNA para fatores angiogênicos como o VEGF.

Em função das características e propriedades estudadas e conhecidas até hoje, muitas pesquisas tem sido desenvolvidas no sentido de aplicar VEGFs de forma terapêutica em uma série de afecções. Sabe-se que o estreitamento ou obstrução de artérias coronárias ou artérias periféricas secundárias a aterosclerose, pode causar doença coronariana grave ou doença arterial periférica, diminuindo a perfusão e levando à isquemia de tecidos. Em alguns ensaios clínicos, o VEGF foi usado para estimular a formação de vasos colaterais melhorando a perfusão de tecidos adjacentes (GRUCHALA et al., 2004).

A angiogênese constitui um evento precoce da hiperplasia sinovial o que presumidamente promove a destruição de osso e cartilagem nos estágios tardios da artrite reumatóide. Neovasos ajudam no suporte de nutrientes, porém colaboram para o aumento do fluxo de células e mediadores inflamatórios, aumentando o processo inflamatório sinovial. Estratégias anti-angiogênicas podem então se tornar uma ferramenta valiosa no tratamento das artrites reumatóides (LAINER; BRAHN, 2005).

Neoplasias malignas são caracterizadas pela proliferação celular descontrolada, cujo crescimento deve ser sustentado por um aporte de sangue e nutrientes. Desta forma, diz-se que o crescimento e metástase tumorais são angiogênese dependentes (ROY et al., 2006). A participação dos VEGFs na angiogênese tumoral têm sido bastante estudada justamente para desenvolver estratégias que possam retardar a formação de vasos, diminuindo assim, o crescimento e possíveis metástases. Sabe-se, por exemplo, que o VEGF-B tem papel na fase precoce de desenvolvimento de tumores ou em carcinomas orais de células escamosas, mas ainda poucos dados são conclusivos em mostrar a mesma importância para o crescimento destes tumores (NASH et al., 2005). Alguns tumores tais como carcinoma de mama, pulmão e intestino, têm, no entanto, propensão a desenvolverem metástases via vasos linfáticos. VEGF-C e VEGF-D juntamente com receptor VEGFR-3 estimulam processo de linfangiogênese e atribui-se a estes fatores grande atuação no processo de metástases destes tumores (ROY et al., 2006).

Aos VEGFs ainda são atribuídas participações em algumas doenças oculares. A retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) é caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular levando a edema e acúmulo de lipoproteínas na camada plexiforme externa da retina e pequenas hemorragias e microaneurismas retinianos. Em

estágios mais avançados da doença observa-se neovascularização periférica que caracteriza a retinopatia diabética proliferativa (RDP). Expressão aumentada de VEGF-A foi descrita em NPDR assim como níveis mais elevados deste mesmo fator foram detectados em humor aquoso de pacientes portadores de RDP. A maculopatia relacionada à idade (MRI) é considerada uma das maiores causas de perda de visão central em humanos. Apresenta-se de duas formas: neovascular e não-neovascular, sendo esta última a mais comum. A perda de visão ocorre devido a um dano nos fotorreceptores causado pela neovascularização coroidal e manifestações relacionadas com hemorragias subretinianas ou descolamentos de retina. Níveis elevados de VEGF-A foram encontrados no humor vítreo de pacientes portadores de MRI neovascular, o que nos faz pensar que, mesmo pouco conhecidos, os mecanismos de neovascularização coroidal parecem estar relacionados com elevada expressão de VEGF associado a hipóxia tecidual (WITMER et al., 2003).

Por fim a retinopatia da prematuridade (RP) também parece estar relacionada aos VEGFs. Esta afecção caracteriza-se pela proliferação de vasos sanguíneos em neonatos prematuros que foram mantidos em ventilação mecânica por longo período de tempo e desta forma receberam altas concentrações de oxigênio. A hiperoxigenação oblitera pequenos vasos em desenvolvimento na retina. Uma vez que a criança volta a respirar concentrações normais de oxigênio, a retina entra em hipóxia resultando em aumento da expressão de VEGF e proliferação vascular. O VEGF é expresso por astrócitos e células de Müller que participam do desenvolvimento das camadas vasculares superficial e profunda respectivamente (WITMER et al., 2003).

A neovascularização corneal é uma condição que pode levar à perda importante de acuidade visual, e pode ainda predispor a rejeição de transplantes de córnea ou enxertos de membranas biológicas. O VEGF também desempenha papel fundamental nestes processos. Alguns estudos indicam haver expressão aumentada de VEGF quando a neovascularização é induzida em córnea de ratos por cauterização (EDELMAN et al., 1999). A expressão máxima de mRNA para VEGF ocorre em 24 horas sendo que os níveis de VEGF tem valor máximo em 48 horas e declinam até o 7 dia quando o valor chega próximo ao controle (EDELMAN et al., 1999). Segundo estes autores os níveis de bFGF também aumentam progressivamente e atingem pico máximo ao redor do sétimo dia. Por meio de cortes histológicos e marcação imunohistoquímica para VEGF concluiu-se que polimorfonucleares são responsáveis pelos altos níveis intra-estromais de VEGF entre 24 e 48 horas pós lesão e que

macrófagos expressam VEGF durante a fase proliferativa no quarto dia pós-cauterização.

2.3 Matriz Extracelular e Angiogênese

Para que as células endoteliais migrem em direção ao estímulo angiogênico, porções de matriz extracelular devem ser seletivamente degradadas. As metaloproteinases (MMPs) constituem uma família de enzimas que controlam esta ação.

Estas podem ser classificadas em 4 categorias: Colagenase (MMP-1, MMP-8, MMP-13), Gelatinase A (MMP-2) e Gelatinase B (MMP-9), Estromelisina (MMP-3, MMP-10, MMP-11), incluindo Metaloproteases (MMP-12), classificação originalmente baseada na especificidade em degradar determinados substratos (MOSES, 1997).

Após uma determinada lesão, MMP-9 é a primeira enzima produzida pela córnea humana (FINI et al., 1996). Sua habilidade em degradar colágeno tipo IV presente na membrana basal, permite a separação do epitélio, das camadas estromais (VU; WERB, 1998). Sua atividade durante o processo de cicatrização corneal segue determinado padrão: um rápido crescimento após um dia de cicatrização seguido de um declínio progressivo com transcorrer do processo (MATSUBARA et al., 1991). O mesmo foi observado por Zhang et al. (2002) que além de observarem aumento da expressão de MMP-9 24 horas após a lesão, descreveram que 120 horas após lesão sua atividade mostrava-se praticamente nula.

A expressão e atividade de MMPs na neovascularização corneal pode variar em função da localização em relação a lesão e do tempo de progressão. A expressão de MMP-2 ao contrário da MMP-9 aumenta gradativamente no decorrer do processo angiogênico e concentra-se principalmente em áreas de infiltrado celular adjacentes, predominantemente leucócitos, aos vasos neoformados que sabidamente podem expressar constitutivamente as MMP-2. No entanto, Daniels et al. (2003) afirmam que a expressão de MMP-9 por células de epitélio corneal cultivadas de humanos pode perdurar por 7 dias. A atividade de gelatinase B na angiogênese induzida por álcalis demonstra haver padrão de atividade semelhante ao da MMP-2 refletindo um gradiente de atividade superior na região peri-límbica e inferior no estroma corneal adjacente

(ZHANG et al., 2002). A expressão de MMP-9 acontece de forma mais proeminente nos bordos do epitélio corneal em regeneração, não sendo detectada no estroma neovascularizado (KVANTA et al., 2000).

Aumento da atividade de metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 pôde ser observado em ratos que desenvolveram neovascularização corneal sete dias após cauterização química com nitrato de prata (JANI et al., 2006). Alguns processos patogênicos como infecções por *Pseudomonas aeruginosa* podem ser potencializados pela ação imuno-regulatória e proteolítica da MMP-9 (MCCLELLAN et al., 2006).

Grande variedade de citocinas e fatores de crescimento podem tanto induzir como inibir a expressão das MMPs (FINI et al., 1998). Foi demonstrado que TGF- β pode ser capaz de induzir a expressão de gelatinases (MMP-9), collagenases (MMP-1 e 13) e estromelinas (MMP-3, 10 e 11) culturas de células epiteliais de córnea humana (KIM et al., 2004). Os FGFs também são potente indutores de MMP-9 na angiogênese induzida em córnea de ratos (SIVAK et al., 2002). As IL-1 e IL-6 podem incrementar a expressão de RNA mensageiro pra MMPs associadas a degradação de matriz óssea ativando suas formas ativa e pró-ativa (KUSANO et al., 1998).

Parece existir uma correlação bastante significativa entre VEGFs e MMPs tanto na córnea como em outros tecidos. VEGFs podem induzir a secreção de uma variedade de MMPs tais como a collagenase intersticial (MMP-1), estromelina-1 (MMP-3), estromelina-2 (MMP-10) e gelatinase (CASEY; LI, 1997). Inibidores teciduais endógenos de metaloproteinases existem para prevenir a degradação excessiva da matriz. A inativação por meio de anticorpos DC101, que se ligam ao VEGFR-2, promove uma marcante redução da expressão de MMP-9 e MMP-13 em modelo experimental de invasão tumoral. Este dado torna-se importante uma vez que a atividade das MMP-9 é considerada fundamental na clivagem de componentes da matriz, particularmente a membrana basal, facilitando a migração das células endoteliais e conseqüentemente a invasão tumoral (VOSSELER et al., 2005). O bloqueio de VEGFR-2 demonstrou ser capaz de reduzir a secreção de MMP-2 e MMP-3 em células endoteliais da microvasculatura de cérebro humano, inibindo inclusive sua migração (WAGNER et al., 2003).

A migração das células endoteliais através da matriz extracelular é ainda estreitamente mediada por uma família de moléculas de adesão de superfície celular chamadas de integrinas. Duas integrinas de maior importância na angiogênese ocular são a $\alpha_v\beta_3$ (avb-3) e $\alpha_v\beta_5$ (avb-5). A primeira controla o número de funções vitais das

células do endotélio vascular, regulando, por exemplo, proliferação, crescimento ou apoptose (BROOKS et al., 1994).

Para que exista uma degradação ordenada de matriz extracelular fatores pró-angiogênicos devem ser modulados por fatores anti-angiogênicos tais como, Fator Transformador de Crescimento Alfa (TGF- β) e o inibidor tecidual de metaloproteinases-3 (TIMP-3). Quando existe um balanço favorável entre os fatores pró-angiogênicos o desenvolvimento de novos vasos é iniciado (ARBISER et al., 1997).

2.4 Modelos de Angiogênese

A angiogênese corneal pode ser considerada, um dos melhores ensaios *in vivo* existentes, uma vez que a córnea é um tecido avascular. Sendo assim, todos os vasos formados após o estímulo podem ser considerados como novos vasos (AUERBACH et al., 2003).

Uma grande variedade de ensaios tem sido desenvolvida para estimular a formação de novos vasos na córnea. Uma vez que se consiga obter a formação de vasos na córnea pode-se avaliar então fármacos ou métodos que tenham a intenção de inibir a formação ou promover a regressão destes vasos. Feito isto, a rede vascular é quantificada quanto ao número e densidade de vasos bem como o comprimento.

O implante de membranas biológicas é um método eficiente para obtenção de neovascularização. O implante estomal de pericárdio eqüino foi comparado à membrana amniótica eqüina quanto a sua capacidade angiogênica em córneas de ratos por Safatle (1998). A vascularização obtida pelo pericárdio demonstrou-se mais intensa sugerindo haver maior potencial angiogênico. Em ambos os implantes a vascularização máxima ocorreu ao 15 dias pós-implantação. Freddo (2003) utilizou-se da implantação de membrana amniótica eqüina em “microbolsa” em córnea de ratos como estímulo angiogênico para verificar a ação da ciclosporina 0,2% na inibição da formação de vasos. Com este método observou início de vascularização a partir do 3º dia pós-operatório, pico no 7º dia pós-operatório e lenta diminuição até o 15º dia pós-operatório.

O modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelhos induzida experimentalmente pela cauterização alcalina pontual por hidróxido de sódio é bastante descrito na literatura. Uma das técnicas consiste em aplicar sobre a superfície corneal

um papel de filtro de formato circular embebido em solução de NaOH 1M por 2 minutos (FECHINE-JAMACURU et al., 2005). A resposta angiogênica mostrou-se crescente até o 12º dia e manteve-se estável até o 21º dia. O NaOH também pode ser instilado em córnea de ratos e com auxílio de debridamento mecânico provocar desnudamento epitelial da córnea e limbo, promovendo angiogênese (SINGH et al., 2005).

Outro método bastante utilizado em ensaios de angiogênese é a aplicação de pontos simples separados com fios de náilon 10-0 em córneas de ratos. Observa-se início da vascularização aos 3 dias pós-operatórios e vascularização máxima ao redor da terceira semana pós-operatória. (KWAK et al., 2002; STUART et al., 2003).

Alguns fatores indutores de angiogênese podem ser usados para promover de forma controlada e precisa a formação de vasos na córnea. Uma micro bolsa estromal é criada e um “pellet” contendo fatores de crescimento promotores de angiogênese são implantados. Fator de crescimento fibroblástico (bFGF) foi aplicado desta forma para observar o efeito anti-angiogênico da rapamicina em córnea de coelhos por Know e Kim (2006). Este método mostrou-se efetivo na detecção da inibição promovida pela rapamicina. Em ratos esta técnica também é viável. Discos compostos de náilon impregnados por VEGF e bFGF podem ser implantados em micro bolsas em córneas de ratos e promover vascularização que persiste mais do que 7 dias após implantação (COXON et al., 2002).

Método bastante simples e eficaz de se promover neovascularização corneal, a cauterização química por nitrato de prata, tem sido usada como modelo de indução de angiogênese. Mimura et al. (2001) conduziram estudo da expressão de VEGF-C e VEGFR-3 em linfangiogênese corneal baseando-se neste modelo que consiste na aplicação de um cristal ou bastão de nitrato de prata sobre o centro da superfície corneal durante 3 segundos. Observou-se o rápido crescimento de vasos nas primeiras 2 semanas e estabilização ao redor de 4 semanas. No mesmo estudo demonstraram que VEGF-C e VEGFR-3 tem suas expressões aumentadas a partir do 3º dia após lesão.

A localização e o tempo de aplicação do nitrato de prata podem variar. Benelli et al. (1998) aplicaram este método para determinar o efeito anti-angiogênico do heparan sulfato em córneas de ratos. Para tanto utilizaram 7 segundos de contato do nitrato de prata agora não mais na região central, mas a 2 mm do limbo. Segundo os mesmos autores o posicionamento mais periférico da lesão preserva a visão e minimiza o desconforto. Para este modelo a área de vascularização verificada após seis dias de

lesão foi de $7,15 \text{ mm}^2 \pm 0,52$. Quando se utilizam 15 segundos de contato do cristal de nitrato de prata posicionado centralmente na córnea, observa-se início do crescimento vascular a partir de 48 horas e comprimento máximo aos sete dias após lesão (PETRI, 1997).

Comparando-se a resposta angiogênica entre machos e fêmeas, não se observa diferença quando se realiza cauterização corneal com nitrato de prata por vinte segundos, com exceção ao 7º dia onde a resposta das fêmeas é significativamente maior (PEREIRA, 1996).

A quantificação dos vasos neoformados também constitui etapa fundamental dos modelos de angiogênese. É possível obter dados referentes ao comprimento dos vasos bem como da área vascularizada. Existem atualmente na literatura, descrições de diversos métodos de marcação, avaliação e contagem da rede vascular induzida. Um simples exame com lâmpada de fenda, por exemplo, pode ser usado de forma subjetiva para determinar escores de neovascularização.

A perfusão de tinta da china é uma técnica que consiste na injeção de tinta pelo sistema vascular que resulta na marcação dos vasos neoformados. As córneas são diafanizadas, possibilitando a contagem posterior (FREDDO, 2003; PEREIRA, 1996; PETRI, 1997). Este método de marcação foi usado por Edelman et al. (1999) para quantificar a progressão da neovascularização induzida por 2 segundos de contato de nitrato de prata em córneas de ratos e observaram que nas primeiras 24 horas já havia dilatação das artéria e veias perilímbicas. Aos 4 dias pós-cauterização uma rede vascular mais densa progredia de forma centrípeta em direção a lesão. No sétimo dia a malha vascular era menos densa, porém os vasos adquiriram aparência mais madura, com menos ramificações e mais alongados.

Coloração imunohistoquímica específica para endotélio vascular é uma técnica que consiste em adicionar anticorpos, por exemplo, CD31, que se ligam ao endotélio e que quando expostos à microscopia de fluorescência sinalizam os vasos possibilitando contagem bastante precisa (AMBATI et al., 2002).

Método bastante descrito em trabalhos para se obter dados referentes ao comprimento e área neovascularizada após a marcação, consiste na obtenção de fotografias digitais sob magnificação padronizada seguida de análise por softwares apropriadamente desenvolvidos para este fim tais como o Image Tools, ver. 2.0 (SEO et al., 2001), KS 300 ver. 1.2 (BENELLI et al., 1998), Metamorph Image Analysis System

ver 4.5 (COXON et al., 2002), Image Pro-Plus (RODRIGUES, 2005) entre outros, que garantem maior precisão e menor subjetividade à quantificação.

2.5 Terapia Anti-Angiogênica

Muitos esforços têm se concentrado no desenvolvimento de estratégias para inibição de fatores de crescimento participativos no processo de angiogênese com intuito de aumentar a eficiência do tratamento de doenças como aquelas ora citadas.

Na busca de tratamento mais eficaz para o câncer de colo em humanos, fármacos de ação antiangiogênica vêm sendo utilizados, com relativo sucesso, na tentativa de diminuir o crescimento tumoral uma vez que sua agressividade tem sido correlacionada à densidade de microvasos formados.

Em oftalmologia, o uso de fármacos anti-VEGF tem crescido nos últimos anos. A expressão acentuada de VEGF induz proliferação endotelial e incrementa permeabilidade vascular, eventos estes que estão presentes nos quadros de neovascularização coroidal em pacientes portadores de MRI, em que se observa clinicamente presença de fluido subretiniano.

O primeiro estudo clínico utilizando uma substância anti-angiogênica para o tratamento de neovascularização coroidal em pacientes portadores de MRI foi realizado pelo Eyetech Study Group (2003). Neste estudo, fizeram uso de um aptâmero, uma pequena molécula estável similar a um RNA que se liga exclusivamente e com alta afinidade à isoforma de 165-KDa do VEGF humano. Nenhum efeito adverso foi relacionado com uso deste aptâmero sendo que 87,5% dos pacientes demonstraram estabilização ou melhora da visão três meses após o tratamento. Quando associada à terapia fotodinâmica pode ser ainda mais eficaz. Segundo Csaky (2003) o grande benefício desta terapia antiangiogênica é a estabilização ou melhora visual a longo termo.

Ao contrário do aptâmero, o rhuFab V2 ou ranibizumab (Lucentis[®], Genetech Inc, South San Francisco, CA) possui um fragmento ativo de anticorpo monoclonal humanizado anti-VEGF, conferindo-lhe um espectro de ação mais amplo, ligando-se a todas as isoformas de VEGF. Apresenta capacidade de penetrar em todas as camadas da retina (GAUDREAULT et al., 1999) muito provavelmente devido ao seu baixo peso

molecular (48 KDa). Estudos farmacocinéticos da aplicação intravítrea conduzidos em primatas não humanos mostraram que a meia vida do ranibizumab é de aproximadamente três dias. O fármaco se distribuiu rapidamente para a retina, atingindo pico máximo 6 horas após aplicação (GAUDREAULT et al., 2005). Os níveis séricos encontraram-se baixos, mostrando que existe ampla distribuição e rápido metabolismo séricos. Para aplicações endovenosas a meia vida cai para 12 horas.

Visto que o VEGF desempenha papel importante no desenvolvimento da MRI, estudos clínicos multi-cêntricos estão avaliando aplicações intravítreas de ranibizumab em pacientes portadores desta doença com resultados animadores. Aplicações mensais de ranibizumab intravítreas com doses de 0,3 e 0,5 mg foram usadas em 64 pacientes humanos com MRI num total de quatro aplicações. A acuidade visual melhorou $9,4 \pm 13,3$ letras e $9,1 \pm 17,2$ letras respectivamente (HEIER et al., 2006). Alguns efeitos colaterais leves foram observados tais como inflamações reversíveis e pequenas hemorragias no local da aplicação. Os efeitos colaterais mais graves foram iridociclites, endoftalmites e oclusão da veia central da retina, mas estes ocorreram com frequência muito pequena (1 caso cada). Foi observado aumento transitório da pressão intra-ocular em 22,6% dos pacientes tratados.

Estudos anteriores iniciados por Rosenfeld et al. (2005) haviam determinado que a dose máxima tolerada, quando se submetia pacientes portadores de MRI a injeções únicas de ranibizumab, era de 500 µg. Para tanto foram avaliados parâmetros tais como presença de inflamação intra-ocular, elevação da pressão intra-ocular, redução da acuidade visual ou hemorragia. Todos os pacientes submetidos à dose de 500µg apresentaram melhora da acuidade visual quando comparada ao início do tratamento. Em doses superiores a 500µg observou-se inflamação intra-ocular intensa.

Posteriormente Rosenfeld et al. (2006) propuseram estudo em que se aumentavam as doses progressivamente a cada 2 ou 4 semanas e observaram que a dose máxima tolerada passou para 2,0 mg. Na medida em que se aumentava a dose, havia uma tendência a se observar menor inflamação após cada injeção. Em ambos os estudos, não foi detectada presença de anticorpos anti-ranibizumab no soro sanguíneo.

O pegaptanib (Macugen® Eyetech Pharmaceuticals, Inc, NY, New York e Pfizer, Inc, NY, New York), bloqueador específico do VEGF₁₆₅, também foi estudado como terapia anti-VEGF para a MRI. Em estudo clínico realizado por Gragoudas et al. (2004) com pacientes de MRI, o pegaptanib promoveu melhora significativa da acuidade visual em todos os pacientes submetidos a injeções intravítreas. Níveis de endoftalmites e

descolamento de retina foram considerados insignificantes e inerentes a qualquer injeção intravítrea. Sua efetividade também foi comprovada na redução da neovascularizações de retina de pacientes com diabetes mellitus (MACUGEN DIABETIC RETINOPHATY STUDY GROUP, 2006).

Mais recentemente o bevacizumab ou rhu MAab (Avastin[®], Genetech Inc, South San Francisco, CA), têm sido usado como fármaco anti-VEGF. Trata-se de um anticorpo monoclonal humanizado que se liga e neutraliza seletivamente a atividade biológica do VEGF (BULA) e pode reconhecer todas as isoformas de VEGF-A (WEDAN et al., 2006). Mais especificamente o bevacizumab inibe a ligação do VEGF com seus receptores Flt-1 e KDR na superfície das células endoteliais. A meia vida estimada do fármaco é de 20 dias enquanto que o tempo para atingir o tempo de equilíbrio é de aproximadamente 100 dias.

Seu uso foi aprovado há cerca de dois anos pelo Food and Drug Administration para tratamento de câncer de cólon e reto metastáticos em associação à quimioterapia. Em alguns estudos têm-se aplicado bevacizumab no tratamento coadjuvante ao tratamento de tumores, apontando vantagens da associação à quimioterápicos tradicionais. Emmanouilides et al. (2006) avaliaram a eficácia da associação de bevacizumab na dose de 5 mg/Kg a cada 2 semanas por via intravenosa com 5FU/leukovorin em dose padrão para o tratamento do câncer de cólon e reto. Alguns efeitos colaterais observados foram hipertensão arterial mediana, epistaxe e discreta hematúria. Dos 19 pacientes estudados, 9 apresentaram estabilização da doença ao passo que os outros 10 tiveram progresso continuado. Comparando-se pacientes tratados com bevacizumab em associação a 5FU/leukovorin ao tratamento padrão com 5FU/leukovorin observou-se maior tempo para progressão da doença bem como taxa de sobrevida mais elevada quando se usa a associação. Estes parâmetros são tão melhores quanto se aumenta a dose administrada. Administração de 5mg/Kg e 10mg/Kg a cada 2 semanas aumentou 3,8 e 2 meses respectivamente o tempo médio estimando para progressão da doença frente a terapia única com 5FU/leukovorin (KABBINAVAR et al., 2003). Sabe-se também que esta associação quimioterápica não causa complicações relacionadas à cicatrização pós-cirúrgica em pacientes portadores de câncer de colo e reto (SCAPPATICCI et al., 2005).

Relatos do uso de bevacizumab em outros tipos de tumores já foram publicados na literatura como Bidus et al. (2005) que trataram 3 pacientes portadoras de

carcinomas ovarianos bem diferenciados com aplicações de 15mg/m^2 e obtiveram resposta significativamente prolongada variando de 15 a 22 meses.

Assim como o ranibizumab e o pegatagnib, o bevacizumab tem sido cada vez mais utilizado em oftalmologia. Atualmente tem sido intensivamente usado para o tratamento da MRI. Em estudo clínico, Michels et al. (2005) avaliaram a eficácia e segurança da aplicação endovenosa de 5mg/kg de Avastin em 9 pacientes portadores de MRI com neovascularização coroidal subfoveal. Nenhum efeito colateral grave foi observado quer seja sistêmico ou ocular. Apenas um caso de elevação da pressão arterial, facilmente controlado. Com relação à progressão da MRI, já havia melhora significativa da acuidade visual após uma semana da aplicação, mais evidente após 12 semanas. Por meio de tomografia de coerência óptica (OCT), notaram marcante diminuição da espessura da retina central e o estudo angiográfico mostrou redução ou até mesmo ausência de fluidos.

Atualmente os ensaios clínicos têm se concentrado na avaliação da aplicação intravítrea de bevacizumab em pacientes com MRI, como fizeram Avery et al. (2006) que trataram 81 olhos de 79 pacientes com MRI, e neovascularização subfoveal. O estudo consistia em realizar aplicações intravítreas de $1,25\text{ mg}$ com intervalos mensais até que o edema macular, fluido subretiniano e descolamento do epitélio pigmentário não mais fossem observados. Assim como na administração sistêmica não houve efeitos colaterais oculares ou sistêmicos importantes. Após uma semana da aplicação, 55% dos pacientes já apresentavam redução de 10% da espessura retiniana e após 4 semanas 30 dos 81 olhos mostraram resolução completa do espessamento retiniano, fluido subretiniano ou descolamento do epitélio pigmentário.

A injeção intravítrea além de eficiente no aspecto terapêutico apresenta-se bastante segura quanto aos efeitos tóxicos na retina quando aplicados $0,05\text{ ml}$ até $0,2\text{ ml}$ (FEINER et al., 2006).

A rápida resposta observada é muitas vezes questionada. Uma possível explicação deve-se ao fato de na presença de fluidos subretinianos a retina se tornar mais permeável a moléculas maiores como as de bevacizumab. Outra hipótese é a de que a dose de $1,25\text{ mg}$ é suficiente para enfraquecer as barreiras de difusão de forma a permitir a ação biológica do bevacizumab (AVERY et al., 2006).

A monitoração dos níveis séricos de VEGF_{165} após terapia sistêmica de bevacizumab em pacientes com MRI, mostrou haver uma redução significativa destes

níveis após a quarta semana, retornando aos níveis basais apenas ao redor do sexto mês (ROSIN et al., 2006).

Outra finalidade do bevacizumab foi explorada por Kahook et al. (2006) em um paciente com glaucoma neovascular seguido de oclusão da veia central e importante desconforto ocular. Com o fracasso do controle da pressão intra-ocular (PIO) pela ciclofotocoagulação transescleral, optaram pela injeção de 1 mg intra vítrea. Após 48 horas houve redução da PIO de 48 para 22 mmHg e o paciente relatava ausência de desconforto. A regressão da neovascularização foi sustentada por 6 semanas. Kahook et al. (2006) usaram este fármaco para revisão de bolha filtrante pós trabeculectomia em um paciente que já havia passado por uma revisão prévia com mitomicina C sem sucesso, optando pela injeção de 1 mg na bolha. Após 48 horas a PIO havia reduzido de 25 para 7 mmHg e o paciente não relatava desconforto ocular. Foi observada também redução da neovascularização da bolha. Esta condição se manteve por duas semanas.

Os efeitos anti-angiogênicos do bevacizumab foram avaliados em córneas de ratos após indução de neovascularização por cauterização química com nitrato de prata por Ren et al. (2006), utilizando-se de aplicação tópica em forma de colírio. Como resultado observaram menor área neovascularizada, 38,2% contra 63,5% no grupo controle.

O tratamento sistêmico com bevacizumab pela via intraperitoneal resultou em efeito anti-angiogênico para o modelo de neovascularização inflamatória induzida por sutura em córnea de camundongos (BOCK et al., 2006). Os mesmos autores sugerem que este fármaco poderia ser utilizado como terapia anti-angiogênica pré e pós ceratoplastia para promover a viabilidade do implante.

A aplicação subconjuntival parece ser uma via de administração eficiente quando se pretende obter inibição de neovascularização, como foi proposto por Liu et al. (2006). Neste estudo, realizado em ratos, a administração subconjuntival de um “seqüestrador” de VEGF (VEGF trap) promoveu inibição dose-dependente da neovascularização, bem como redução do infiltrado leucocitário. A administração sistêmica do mesmo fármaco não resultou em inibição da angiogênese bem como do infiltrado leucocitário corneais.

In vitro o bevacizumab aparentemente promove redução da sobrevivência de fibroblastos de forma dose-dependente mostrando-se como uma nova forma, ainda que experimental, de tratamento de doenças fibrovasculares da córnea (GUERRIERO et al., 2006).

3 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos inibidores de angiogênese pela aplicação subconjuntival de bevacizumab (Avastin®), em córnea de ratos Wistar, machos, em diferentes períodos de tempo, valendo-se da mensuração da densidade da rede vascular.

Aplicando-se o mesmo modelo experimental de angiogênese, foram determinadas em homogeneizados de córneas as atividades de metaloproteinases 2 e 9 nos mesmos intervalos de tempo por meio de zimografia.

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 68 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) Berkenhout, 1769 (Redentia, Muridae), com 8 a 10 semanas de idade pesando de 300 a 350g, originários do Biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo. Durante o período de experimentação, os animais permaneceram em gaiolas apropriadas, recebendo água e ração balanceada “*ad libitum*”.

4.1 Avaliação da Angiogênese

4.1.1 Grupos Experimentais

Para avaliação da angiogênese, 20 animais foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada. O grupo **GC** referente ao grupo controle, recebeu injeção de 0,02 ml de solução fisiológica pela via subconjuntival no momento da lesão. O grupo **G0** recebeu aplicação de 0,02 ml de bevacizumab (Avastin®) pela via subconjuntival no momento da lesão. O grupo **G3** recebeu aplicação de 0,02 ml de bevacizumab (Avastin®) pela via subconjuntival no terceiro dia após a lesão. O grupo **G5** recebeu aplicação de 0,02 ml de bevacizumab (Avastin®) pela via subconjuntival no quinto dia após a lesão. A aplicação de bevacizumab foi padronizada na localização de 12 horas no espaço subconjuntival. Para tanto utilizamos seringa de insulina de 0,3 ml dotada de agulha 12,7 mm de comprimento e calibre 0,33 mm.

Todos os animais foram sacrificados ao sétimo dia após a lesão.

4.1.2 Anestesia

Os ratos foram anestesiados por vaporização de Halotano em câmara fechada e a anestesia foi mantida com uso de máscara. Utilizou-se ainda anestesia tópica com colírio anestésico de proparacaína (Anestalcon[®]).

4.1.3 Cauterização da Córnea

Com intuito de diminuir o número de animais utilizados, foram cauterizadas as córneas de ambos os bulbos oculares pelo contato de ponta de cristal de nitrato de prata por 10 segundos. A lesão foi posicionada de forma paracentral a 2 mm do limbo com auxílio de paquímetro cirúrgico no ponto correspondente a 12 horas. Após a indução da lesão, os bulbos oculares foram abundantemente lavados com solução fisiológica. Todo procedimento foi realizado sob magnificação em microscópio cirúrgico (M900 - DF Vasconcelos[®]) e de acordo com o *Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research* da *Association for Research on Vision and Ophthalmology* (ARVO).

4.1.4 Analgesia

Ainda que a imensa maioria dos trabalhos que utilizam este modelo experimental não menciona o uso de analgésicos pós-operatórios optou-se por realizar aplicação de Metadona na dose de 2mg/kg, por via subcutânea a cada 12 horas por dois dias, período este que eventualmente pode cursar com dor mais significativa.

4.1.5 Eutanásia

No 7º dia após a lesão os animais foram eutanasiados e suas córneas removidas. Procedeu-se a eutanásia por hiperinalação de halotano em câmara fechada até a verificação de paradas respiratória e cardíaca.

4.1.6 Preenchimento do Leito Vascular

No 7º dia, após a cauterização corneal, os animais foram anestesiados com Halotano e submetidos à injeção intra peritoneal de heparina (500 UI). Após eutanásia, a pele da região torácica ventral foi rebatida, e o tórax aberto por secção mediastínica. Os animais foram exangüinados através de incisão na ponta do ventrículo esquerdo e o tronco bráquio-cefálico foi canulado com auxílio de cateter número 24. Após a canulação, 20 ml de tinta da China (Faber-Castell®, preto) foram administrados lentamente para o preenchimento dos leitos vasculares. A seguir, os globos oculares foram enucleados, incisionando-se a conjuntiva palpebral, musculatura, vasos retrorbitários e nervo óptico e então fixados em formol a 10%.

4.1.7 Desidratação e Diafanização Corneal (Método de Spaltholtz)

Após 48 horas, os globos oculares foram desidratados em soluções crescentes de álcoois (50°GL, 60°GL, 70°GL, 80°GL, 95°GL e absoluto) em passagens de 24 horas em cada solução, diafanizados em benzol (duas passagens de 24 horas cada) e posteriormente, mantidos em solução de salicilato de metila e benzoato de benzila na proporção de 5:3. Após procedimento de desidratação e diafanização, as córneas foram removidas e seccionadas em 2 partes iguais. Como a lesão não foi realizada na porção central, cada metade foi denominada de: **L** – metade que contém a lesão e **SL** – metade que não contém a lesão (Figuras 9 e 10). Os fragmentos foram estendidos por 48 horas entre lâminas e pressionados por presilhas (prendedor tipo gramopol), para em

seguida serem montados em resina sintética (Permunt[®]), entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de luz.

4.1.8 Análise das Imagens

As áreas preenchidas por tinta da China, correspondentes aos vasos neoformados, foram quantificadas em sistema de captação e análise de imagem computadorizada Image-Pro-Plus[®]. Para tanto as lâminas foram observadas em aumento de 40 vezes (objetiva de 4 vezes). Uma área retangular medindo 1350 X 1020 μm correspondente à área de 1,377 mm^2 foi padronizada. Três áreas distintas e mais representativas quanto à vascularização de cada metade da córnea (L e SL) foram escolhidas. Os vasos delimitados por este retângulo eram então demarcados. O valor obtido pela divisão da área neovascularizada pela área padrão corresponde à proporção da área da córnea ocupada por vasos sanguíneos ou densidade vascular (CAO; CAO, 1999).

4.1.9 Análise Estatística

Para avaliação das diferenças das médias de densidade vascular entre os grupos experimentais foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para as amostras dos grupos L verificou-se não haver distribuição normal. Logo foi utilizado para a análise de significância o teste Anova não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunn ($p < 0,05$).

Para os grupos SL o teste de Kolmogorov-Smirnov determinou distribuição normal para os 4 grupos. Sendo assim aplicou-se o teste Anova seguido do teste de comparações múltiplas de Turkey ($p < 0,05$).

4.2 Atividade de Metaloproteinases

4.2.1 Grupos experimentais

Para esta etapa do trabalho foram utilizados 48 animais sendo que 40 destes foram divididos eqüitativamente nos seguintes grupos: O grupo **GC**, referente ao grupo controle, recebeu injeção de 0,02 ml de solução fisiológica pela via subconjuntival no momento da lesão. O grupo **G0** recebeu aplicação de 0,02 ml de bevacizumab (Avastin[®]) pela via subconjuntival no momento da lesão. O grupo **G3** recebeu aplicação de 0,02 ml de bevacizumab (Avastin[®]) pela via subconjuntival no terceiro dia após a lesão. O grupo **G5** recebeu aplicação de 0,02 ml de bevacizumab (Avastin[®]) pela via subconjuntival no quinto dia após a lesão. Todos os animais foram sacrificados no sétimo dia após a lesão. A aplicação de bevacizumab foi padronizada na localização de 12 horas no espaço subconjuntival. Para tanto utilizamos seringa de insulina de 0,3 ml dotada de agulha 12,7 mm de comprimento e calibre 0,33 mm. Os oito animais restantes foram usados para se estabelecer o padrão de atividade de MMPs em córneas normais sem lesão (**CN**).

4.2.2 Anestesia

Os ratos foram anestesiados por vaporização de Halotano em câmara fechada e a anestesia mantida com uso de máscara. Foi utilizada ainda anestesia tópica com colírio anestésico de proparacaína (Anestalcon[®]).

4.2.3 Cauterização da Córnea

À semelhança do que foi procedido para a avaliação da angiogênese, a cauterização corneal foi realizada com ponta de cristal de nitrato de prata a 2 mm do limbo por 10 segundos na localização de 12 horas.

4.2.4 Analgesia

De forma semelhante ao que foi procedido nos grupos para avaliação da angiogênese optou-se por realizar aplicação de Metadona na dose de 2mg/kg, por via subcutânea a cada 12 horas por dois dias.

4.2.5 Eutanásia

No 7º dia após a lesão os animais foram eutanasiados e suas córneas removidas. A eutanásia foi procedida por hiperinalação de halotano até a verificação de paradas respiratória e cardíaca.

4.2.6 Zimografia

Após a eutanásia, os globos oculares foram enucleados, incisando-se a conjuntiva palpebral, musculatura, vasos retrorbitários e nervo óptico. As córneas foram removidas, excluindo-se o limbo e colocadas em solução salina resfriada para processamento e análise da atividade de MMP-2 e MMP-9 por meio de zimografia.

As amostras foram então lavadas com tampão Tris-HCl 0,05M, 0,15M NaCl, pH 7,4. Um pool de quatro córneas foi homogeneizado em 2 mL de tampão Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,2M NaCl, 5mM CaCl₂ e 0,1% de Triton X-100, por 2 vezes consecutivas de

20 s. O homogeneizado foi submetido à centrifugação a 8000g durante 20min, à 4 °C, em centrífuga de mesa refrigerada, Eppendorf 5403. O sobrenadante foi empregado como amostra.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), e as amostras contendo 20 µg de proteína foram submetidas à eletroforese (100 V, 1,5 h, sistema Mini-Protean III BioRad), em gel de poliacrilamida 30% contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), copolimerizado com 0,5 % de gelatina.

Ao final da corrida o gel foi cortado em tiras e lavado com Triton 2,5 % para remoção do SDS. O gel foi então incubado a 37°C por 18h em tampão de incubação 0,05M Tris-HCl, 5mM CaCl₂, 5 µM ZnCl₂, pH 8,0. Os géis foram a seguir corados com Coomassie Brilliant Blue por 30 min a temperatura ambiente e descorados com água contendo 10% de metanol e 10 % de ácido acético. As gelatinases aparecem como regiões não coradas de gelatina (INOMATA et al., 2003). O gel foi digitalizado (450 d.p.i.) em Densitômetro de Calibração GS-700 BIO-RAD e as intensidades das bandas e pesos moleculares calculados utilizando o programa Molecular Analyzer (Versão 1.4). As bandas foram analisadas contra padrão de Peso Molecular (Low range, BioRad, Hecules, CA) e padrão de metaloproteínases (Gelatinase zymography standards for human MMP-2 and human MMP-9, Chemicon, Temecula, CA).

4.2.7 Análise Estatística

Empregou-se a Análise de Variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Turkey-Krammer para múltiplas comparações. A significância utilizada foi de $p < 0,05$ para cada comparação.

5 RESULTADOS

Para facilitar a compreensão dos resultados estes foram divididos em: avaliação da angiogênese e avaliação da atividade de metaloproteinases.

5.1 Avaliação da Angiogênese

A partir das imagens obtidas dos vasos corneais neoformados preenchidos pela tinta da china, podemos perceber que há maior resposta angiogênica nas regiões mais próximas da lesão, que pode ser comprovado quando se observa tanto o valor individual (Gráficos 1 a 4), quanto à diferença existente entre as médias das densidades vasculares entre os grupos L e SL (Gráficos 5 e 6).

A análise das médias das densidades obtidas demonstrou que a lesão por nitrato de prata promoveu maior resposta angiogênica traduzida pela densidade vascular média superior no grupo controle quando comparado aos demais grupos. A tabela 1 mostra os resultados obtidos para densidade vascular média entre os diferentes grupos testados. A densidade média resultante para o grupo GCL foi de $0,5356 \pm 0,1511$, representando média de densidade vascular superior em cerca de 34% quando comparado ao G0L, 43% quando comparado ao G3L e 33% quando comparado ao G5L. Quando as médias de densidades vasculares são comparadas entre si concluiu-se que existe diferença estatisticamente significativa entre o grupo GCL em relação aos grupos tratados nos diferentes períodos, porém quando os grupos tratados são comparados entre si não se observam diferenças significativas estatisticamente.

Os valores médios de densidade vascular obtidos para o grupo GCSL mostraram-se discretamente superiores aos demais grupos apresentando diferença estatisticamente significativa apenas quando comparado aos grupos G0SL e G3SL. Quando se comparam as médias de GCSL e G5SL não se observa diferença estatisticamente significativa assim como quando os grupos tratados são comparados uns aos outros. Os valores médios das densidades vasculares dos grupos SL estão apresentados na tabela 2. Para melhor demonstrar a resposta angiogênica, as imagens obtidas pelo preenchimento com tinta da china e captadas pelo sistema de análise de imagens estão apresentadas nas Figuras 1 a 10.

Tabela 1 – Média da densidade vascular e desvio padrão, obtidas pela perfusão com tinta da china após 7 dias de cauterização corneal nos diferentes grupos

Grupos	N	Densidade Vascular (média e desvio padrão)
GCL	10	0,5356 ± 0,1511*
G0L	10	0,3557 ± 0,1880
G3L	10	0,3060 ± 0,1182
G5L	10	0,3586 ± 0,076

A mensuração dos vasos foi realizada após perfusão com tinta da china, com auxílio do sistema de análise de imagens Image Pro-Plus®. **N** = número de olhos por grupo; **GCL**: grupo controle, porção da córnea que contém a lesão; **G0L**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no momento da cauterização, porção da córnea que contém a lesão; **G3L**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 3º dia após cauterização, porção da córnea que contém a lesão; **G5L**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 5º dia após cauterização, porção da córnea que contém a lesão.

* estatisticamente significante quando comparado aos grupos G0L, G3L e G5L ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Média da densidade vascular e desvio padrão, obtidas pela perfusão com tinta da china após 7 dias de cauterização corneal nos diferentes grupos

Grupos	N	Densidade Vascular (média e desvio padrão)
GCSL	10	0,1342 ± 0,4160**
G0SL	10	0,0626 ± 0,0195
G3SL	10	0,0857 ± 0,0338
G5SL	10	0,0916 ± 0,0472

A mensuração dos vasos foi realizada após perfusão com tinta da china, com auxílio do sistema de análise de imagens Image Pro-Plus®. **N** = número de olhos por grupo; **GC**: grupo controle, porção da córnea que não contém a lesão; **G0L**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no momento da cauterização, porção da córnea que não contém a lesão; **G3L**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 3º dia após cauterização, porção da córnea que não contém a lesão; **G5L**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 5º dia após cauterização, porção da córnea que não contém a lesão.

** estatisticamente significante quando comparado aos grupos G0SL ($p < 0,001$) e G3SL ($p < 0,05$)

Gráfico 1 - Representação gráfica das médias das densidades vasculares obtidas ao 7º dia após cauterização corneal, das porções da córnea próximas à lesão (GCL) e das porções distantes da lesão (GCSL) dos indivíduos do grupo controle.

Gráfico 2 - Representação gráfica das médias das densidades vasculares obtidas ao 7º dia após a cauterização corneal, das porções próximas à lesão (G0L) e das porções distantes da lesão (G0SL) dos indivíduos do grupo submetido à aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no momento da cauterização corneal.

Gráfico 3 - Representação gráfica das médias das densidades vasculares obtidas ao 7º dia após a lesão corneal, das porções próximas à lesão (G3L) e das porções distantes da lesão (G3SL) dos indivíduos do grupo submetido à aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 3º dia após cauterização.

Gráfico 4 - Representação gráfica das médias das densidades vasculares obtidas ao 7º dia após a lesão corneal, das porções próximas à lesão (G5L) e das porções distantes da lesão (G5SL) dos indivíduos do grupo submetido à aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 5º dia após cauterização.

Gráfico 5 - Representação gráfica das médias das densidades vasculares e desvios padrão obtidos ao 7º dia após lesão corneal, das porções próximas à lesão (L) do grupo controle e dos grupos submetidos à aplicação de Bevacizumab (Avastin®).

Gráfico 6 - Representação gráfica das médias das densidades vasculares e desvios padrão obtidos ao 7º dia após lesão corneal, das porções distantes da lesão (SL) do grupo controle e dos grupos submetidos à aplicação de Bevacizumab (Avastin®).

Figura 1- Fotomicrografia obtida por meio de microscopia de luz, da córnea de rato do grupo controle, porção próxima à lesão (GCL), preenchidas com tinta da china 7 dias após cauterização química com nitrato de prata. Aumento 40x

Figura 2 - Fotomicrografia obtida por meio de microscopia de luz, da córnea de rato do grupo controle, porção distante da lesão (GCSL), preenchidas com tinta da china 7 dias após cauterização química com nitrato de prata. Aumento 40x

Figura 3 - Fotomicrografia obtida por meio de microscopia de luz, da córnea de rato do grupo submetido à aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no momento da lesão corneal, porção próxima à lesão (GOL), preenchidas com tinta da china 7 dias após cauterização química com nitrato de prata. Aumento 40x

Figura 4 - Fotomicrografia obtida por meio de microscopia de luz, da córnea de rato do grupo submetido à aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no momento da lesão corneal, porção distante da lesão (G0SL), preenchidas com tinta da china 7 dias após cauterização química com nitrato de prata. Aumento 40x

Figura 5 - Fotomicrografia obtida por meio de microscopia de luz, da córnea de rato do grupo submetido à aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 3° dia após lesão corneal, porção próxima à lesão (G3L), preenchidas com tinta da china 7 dias após cauterização química com nitrato de prata. Aumento 40x

Figura 6 - Fotomicrografia obtida por meio de microscopia de luz, da córnea de rato do grupo submetido à aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 3° da lesão corneal, porção distante da lesão (G3SL), preenchidas com tinta da china 7 dias após cauterização química com nitrato de prata. Aumento 40x

Figura 7 - Fotomicrografia obtida por meio de microscopia de luz, da córnea de rato do grupo submetido à aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 5º dia após lesão corneal, porção próxima à lesão (G5L), preenchidas com tinta da china 7 dias após cauterização química com nitrato de prata. Aumento 40x

Figura 8 - Fotomicrografia obtida por meio de microscopia de luz, da córnea de rato do grupo submetido à aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 5º da lesão corneal, porção distante da lesão (G5SL), preenchidas com tinta da china 7 dias após cauterização química com nitrato de prata. Aumento 40x

Figura 9 – Fotomicrografia obtida em microscópio cirúrgico, da córnea de rato submetida à cauterização corneal com nitrato de prata, preenchidas com tinta da china 7 dias após lesão, porção próxima à lesão (L).

Figura 10 - Fotomicrografia obtida em microscópio cirúrgico, da córnea de rato submetida à cauterização corneal com nitrato de prata, preenchidas com tinta da china 7 dias após lesão, porção distante da lesão (SL).

5.2 Análise da Atividade de Metaloproteínases

A análise da atividade das metaloproteínases ao 7º dia após cauterização química com nitrato de prata indica que existe um aumento da atividade de ProMMP-2 e MMP-2 que em córneas normais são bastante baixos ou quase inexistentes no que se refere principalmente à MMP-2. A comparação entre médias dos grupos normais com os controles e os testados, aponta diferença estatisticamente significativa com $p < 0,001$. Igualmente ocorre um aumento da atividade de MMP-9. A tabela 3 apresenta os dados obtidos das médias e desvios padrão das densidades ópticas obtidas para os diferentes grupos, refletindo a atividade das metaloproteínases em questão.

A administração subconjuntival de bevacizumab no momento da cauterização química não alterou os níveis de MMP-2 e ProMMP-2 ao final dos 7 dias de lesão corneal sendo que a diferença entre as médias das densidades ópticas em relação ao grupo controle não apresentarem diferença estatisticamente significativa. Quando o tratamento é procedido no 3º dia após cauterização, os níveis de ProMMP-2 e MMP-2 tendem a diminuir, mas a diferença entre médias em relação ao grupo controle não é significativa estatisticamente. Já aos 5 dias, os níveis de ProMMP-2 apresentaram-se bastante aumentados, superando as médias de densidade óptica dos demais grupos e apresentando diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). O mesmo ocorre com a MMP-2, porém não se observa diferença estatisticamente significativa.

Quanto à atividade da MMP-9, o tratamento com bevacizumab tanto no momento da lesão quanto no 3º dia após a lesão, não demonstrou haver diferença estatisticamente significativa quando comparamos a atividade desta enzima em relação ao grupo controle. À semelhança do ocorrido para a atividade da ProMMP-2 e MMP-2, o tratamento realizado ao 5º dia após a lesão promoveu aumento considerável na atividade da MMP-9. (Gráfico 7 e Figura 11).

Tabela 3 – Atividade de MMP-2, ProMMP-2 e MMP-9 nos diferentes grupos após 7 dias de cauterização corneal com nitrato de prata

	N	MMP-2	ProMMP2	MMP9
CN	8	0,010 ± 0,008*	0,078 ± 0,030*	0,041 ± 0,015*
GC	10	0,090 ± 0,020	0,170 ± 0,039	0,073 ± 0,016
G0	10	0,089 ± 0,024	0,173 ± 0,050	0,084 ± 0,015
G3	10	0,079 ± 0,015	0,143 ± 0,048	0,082 ± 0,007
G5	10	0,123 ± 0,032**	0,208 ± 0,059***	0,113 ± 0,002****

A atividade das MMPs foi medida em homogeneizado de córneas (pool de quatro córneas para córneas normais e pool de cinco córneas para os demais grupos) após 7 dias de cauterização corneal onde **CN**: córnea normal, **GC**: grupo controle; **G0**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no momento da cauterização; **G3**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 3º dia após cauterização; **G5**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 5º dia após cauterização. **N**= Número de animais.

Os valores representam a média da densidade óptica de 4 experimentos.

* estatisticamente significativo quando comparado aos grupos GC, G0, G3 e G5 ($p < 0,001$).

** estatisticamente significativo quando comparado ao grupo G3 ($p < 0,05$).

***estatisticamente significativo quando comparado aos grupos GC ($p < 0,05$), G0 ($p < 0,01$) e G3 ($p < 0,001$).

****estatisticamente significativo quando comparado aos grupos GC ($p < 0,001$), G0 ($p < 0,01$) e G3 ($p < 0,001$).

Gráfico 7 - Representação gráfica das médias e desvios padrão das densidades ópticas obtidas pela atividade de MMP-2, ProMMP-2 e MMP-9 em homogeneizado de córnea de ratos do grupo controle e dos grupos submetidos ao tratamento nos diferentes períodos de tempo.

Figura 11 – Fotografia obtida da zimografia de córnea de ratos após 7 dia de cauterização corneal onde **CN**: córnea normal, **GC**: grupo controle; **G0**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no momento da cauterização; **G3**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 3º dia após cauterização; **G5**: grupo que recebeu aplicação de Bevacizumab (Avastin®) no 5º dia após cauterização.

6 DISCUSSÃO

A córnea tem sido considerada um dos modelos experimentais mais eficazes para mensuração da resposta angiogênica, uma vez que os vasos que seguem algum estímulo agressor podem ser considerados novos vasos (AUERBACH et al., 2003). Esta característica tem sido explorada tanto na obtenção de conhecimentos ligados aos fenômenos fisiológicos que cercam o intrincado processo de neovascularização bem como para realização de testes farmacológicos.

Dentre os vários métodos descritos na literatura para obtenção de novos vasos, o método de cauterização corneal mostrou-se de fácil execução, exigindo apenas o instrumental básico para procedimentos oftalmológicos. A localização e o tempo de aplicação do cristal de nitrato de prata podem variar de acordo com alguns autores. Petri (1997) procedeu lesão na porção central da córnea por 15 segundos, observando início do crescimento vascular já a partir de 48 horas. Benelli et al. (1998) utilizaram o mesmo método, porém o local de cauterização escolhido foi a 2 mm do limbo por um tempo de 7 segundos. E 6 dias já se observavam os vasos atingindo a lesão. Em nosso estudo, optamos por realizar a cauterização também a 2 mm pois concordamos com os autores que afirmam que o posicionamento mais periférico minimiza o desconforto, promovendo resposta angiogênica ótima aos 7 dias pós cauterização.

Este mesmo modelo foi usado Mimura et al. (2001) para determinação da expressão de VEGF-C e seu receptor VEGFR-3 e concluiu que a partir do 3º dia após a lesão se observa aumento dos níveis deste fator.

O VEGF é um dos fatores proangiogênicos mais bem caracterizados atualmente, atuando como estimulador de proliferação e migração das células endoteliais. O interesse pelo estudo deste fator tem aumentado uma vez que está presente em processos fisiológicos, bem como em afecções importantes como retinopatia diabética ou maculopatia relacionada à idade. Os estudos da aplicação clínica de substâncias inibidoras de VEGF na oftalmologia iniciam-se em 2003 pelo *Eye Study Group* obtendo bons resultados no tratamento da MRI. Os bons resultados obtidos fomentaram estudos subseqüentes e outros fármacos inibidores de VEGF foram testados com bastante eficiência tais como o ranibizumab (HEIER et al., 2006; ROSENFELD et al., 2005) e o pegaptanib (GRAGOUDAS et al., 2004), entre outros.

O bevacizumab, um anticorpo monoclonal humanizado que inativa as ligações do VEGF com as células endoteliais, tem sido cada vez mais empregado na oftalmologia à medida que resultados positivos são publicados. A grande maioria da literatura específica relata o uso deste fármaco no tratamento de doenças retinianas tais como a MRI e neovascularização subfoveal. Avery et al. (2006) comentam que a aplicação intravítrea de bevacizumab é capaz de reduzir o edema macular, fluido subretiniano e espessamento retiniano.

O uso deste fármaco na terapia de outras afecções ainda carece de maiores estudos visto que a literatura pertinente ainda é escassa. Bock et al. (2006) utilizaram aplicações intra-peritoneais para promover a inibição da angiogênese corneal com sucesso, o que está de acordo com o que foi obtido em nosso estudo.

Modelo semelhante ao proposto no presente trabalho foi descrito por Ren et al. (2006) para avaliação dos efeitos inibitórios da angiogênese da aplicação tópica de bevacizumab em córnea de ratos. Os autores obtiveram 63,5% de vascularização no grupo controle e 38,2% no grupo tratado por 7 dias. Nossos resultados também apresentam redução da neovascularização nos grupos tratados, ainda que média obtida para o grupo controle tenha sido discretamente inferior (53,5%), sugerindo que ambas as vias de administração podem ser eficientes para inibir a formação de novos vasos corneais.

Quando se comparam os valores das densidades vasculares entre os grupos tratados em nosso experimento, não se observa diferença estatisticamente significativa, o que nos permite dizer que a inibição da angiogênese independe do momento de aplicação do bevacizumab.

Outro evento observado foi o fato das porções de córnea mais distantes da lesão (SL) apresentarem neovascularização inferior em relação às porções próximas à lesão (L) em todos os grupos, isto se deve a diferença quantitativa de substâncias quimiotáticas, promovendo menor estímulo para migração das células endoteliais (AUERBACH et al., 1994). As médias das densidades vasculares para as regiões mais distantes indicam haver diferença significativa quando os grupos eram tratados no momento da lesão e no 3º dia pós-lesão, indicando que pode existir difusão quer seja pela conjuntiva ou pela córnea. Quando o tratamento foi procedido ao 5º dia pós-lesão, não se observa inibição significativa nestas regiões, o que possivelmente pode ser explicado pelo fato das concentrações de VEGF começarem a diminuir a partir do 4º dia atingindo níveis basais ao 7º dia como sugerem Edelman et al.

(1999). O mesmo pode ser verificado para as regiões próximas à lesão onde o grupo G5L apresentou a maior média de densidade vascular dos grupos tratados.

No processo de angiogênese a atividade dos VEGFs como já foi demonstrado, é vital para proliferação das células endoteliais, mas as MMPs tem igual importância uma vez que promove a degradação ordenada de matriz extra-celular para a progressão do vaso em formação. Dentre as diversas categorias de MMPs estão a MMP-2 e MMP-9.

No que concerne a atividade destas MMPs, o modelo experimental utilizado promoveu aumento da atividade da ProMMP-2, MMP-2 e MMP-9 a semelhança do que relataram Jani et al. (2006) que observaram aumento da atividade destas metaloproteinases após 7 dias de cauterização química com nitrato de prata. Segundo Matsubara et al. (1991), a atividade da MMP-9 aumenta rápida e progressivamente até 24 horas após lesão seguindo um declínio até o final da cicatrização. O presente experimento não encontrou resultados semelhantes no que se refere ao grupo que recebeu tratamento ao 5º dia após lesão caracterizado por um aumento da atividade desta enzima. A dose de bevacizumab utilizada pode não ter sido suficiente ao ponto de inibir a atividade das MMPs avaliadas neste tempo de tratamento.

Nossos resultados também não estão de acordo com Zhang et al. (2002) que afirmam que a atividade da MMP-9 aumenta em 24 horas e após 120 horas de lesão retorna a níveis próximos aos basais. Isto pode ser percebido quando comparamos a atividade de MMP-9 nos grupos que sofreram lesão, tratados ou não, com os valores obtidos nas córneas normais. Observam-se então níveis superiores àqueles considerados basais.

No que se refere à atividade de MMP-2 os resultados estão de acordo com a literatura uma vez que os valores obtidos nos grupos lesionados são superiores às córneas normais ao 7º dia após lesão.

Parece existir uma relação entre VEGF e MMPs na medida em que VEGF podem induzir a secreção das MMPs (CASEY et al., 1997). A dose empregada no tratamento com bevacizumab no 3º dia após a lesão pode ter sido adequada na redução dos níveis de VEGF e conseqüentemente na redução da atividade destas metaloproteinases. A inibição da atividade do VEGF em seus receptores VEGFR-2 em modelo experimental de invasão tumoral promoveu marcante redução da atividade de MMP-9 (VOSSELER et al., 2005). O bloqueio do VEGFR-2 também foi

capaz de reduzir a secreção de MMP-2 e MMP-3 em células endoteliais da microvasculatura de cérebro de ratos (WAGNER et al, 2003). Os trabalhos citados estão de acordo com nossos resultados uma vez que sugerem possível supressão indireta da atividade das MMPs pela inibição da atividade do VEGF.

O presente trabalho mostrou haver inibição significativa da angiogênese corneal quando os animais foram submetidos à aplicação subconjuntival de 0,02 ml de Avastin® correspondente a 0,5 mg de bevacizumab. Esta ação foi observada com maior intensidade quando o tratamento foi realizado no 3º dia após cauterização corneal. Entretanto, não foi constatada uma inibição da atividade das MMPs estatisticamente significativa, observando-se apenas uma tendência a redução da atividade das mesmas, principalmente quando o tratamento é realizado ao 3º dia. Em conjunto estes resultados sugerem haver uma indicação de eficácia terapêutica do bevacizumab pela via subconjuntival após 3 dias de uma lesão corneal.

Muitos fatores, que não o VEGF, estão envolvidos no processo de neovascularização. Entretanto a inibição da angiogênese alcançada neste experimento, por meio de sua inativação, à semelhança do que a literatura cita para o tratamento de retinopatias, parece ser uma possibilidade viável quando se pretende manter o tecido corneal livre de vasos sanguíneos. Mesmo conhecendo a relação existente entre VEGF e metaloproteinases, a inibição da atividade alcançada ocorreu a níveis não significantes, carecendo desta forma de mais estudos que possam elucidar a interação deste fármaco com a inibição de sua atividade.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que:

- o modelo de angiogênese produziu neovascularização esperada e de forma mais acentuada nas regiões próximas da lesão do que nas regiões distantes da lesão.
- Houve inibição do processo de angiogênese corneal em todos os tempos de tratamento testados, com maior intensidade no grupo tratado no 3° dia quando comparado ao grupo controle.
- O momento do tratamento não implicou em maior ou menor inibição da angiogênese.
- O modelo de angiogênese adotado promoveu aumento da atividade de metaloproteinases MMP-2, ProMMP-2 e MMP-9.
- Houve uma tendência a diminuição da atividade das metaloproteinases MMP-2 e ProMMP-2 no 3° dia de tratamento sendo que ao 5° dia de tratamento houve um aumento da atividade das mesmas.
- A atividade da MMP-9 não mostrou redução significativa com os tratamentos no momento e 3 dias após a lesão, apresentando um aumento de atividade ao 5° dia de tratamento.

REFERÊNCIAS

- AMBATI, B. K.; JOUSSEN, A. M.; AMBATI, J.; MOROMIZATO, Y.; GUHA, C.; JAVAHERIAN, K.; GILLIES, S.; O'REILLY, M. S.; ADAMIS, A. P. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. **Archives of Ophthalmology**, v. 120, n. 8, p. 1063-1068, Aug. 2002.
- ARBISER, J. L.; MOSES, M. A.; FERNANDEZ, C. A.; GHISO, N.; CAO, Y.; KLAUBER, N.; FOLKMAN, J. Oncogenic haras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 94, p. 816-819, 1997.
- AUERBACH, W.; AUERBACH, R. Angiogenesis inhibition: a review. **Pharmacology and therapeutics**, v. 63, p. 265-311, 1994.
- AUERBACK, R.; LEWIS, R.; SHINNERS, B.; KUBAI, L.; AKHTAR, N. Angiogenesis assays: a critical overview. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 32-40, Jan. 2003.
- AUTERIO, M.; WALTERBERGER, J.; COMMUNI, D.; KRANZ, A.; MOONS, L.; LAM AMBRECHTS, D.; KROLL, J.; PLAISANCE, S.; DE MOL, M.; BONO, F.; Kliche, S.; FELLBRICH, G.; BALLMER-HOFER, K.; MAGLIONE, D.; MAYR-BEYRLER, U.; DEWERCHIN, M.; DOMBROWSKI, S.; STANIMIROVIC, D.; VAN HUMMELEN, P.; DEHIO, C.; HICKLIN, D. J.; PERSICO, G.; HEBERT, J. M.; COMMUNI, D.; SHIBAYA, M.; COLLEN, D.; CONWAY, E. M.; CARMELIET, P. Role of PIGF in the intra and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 936-943, Jul. 2003.
- AVERY, R. L.; PIERAMICINI, D. J.; RABENA, M. D.; CASTELLARIN, A. C.; NASIR, M. A.; GIUSTI, M. J. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, v. 113, n. 3, p. 363-372, May, 2006.
- BATES, D. O.; JONES, R. O. P. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **Lower Extremity Wounds**, v. 2, n. 2, p. 107-120, Jun. 2003.
- BELLOMO, D.; HEADRICK, J. P.; SILINS, G. U.; PATERSON, C. A.; THOMAS, P. S.; GARTSIDE, M.; MOULD, A.; CAHILL, M. M.; TONKS, I. D.; GRIMMOND, S. M.; TOWNSON, S.; WELLS, C.; LITTLE, M.; CUMMINGS, M. C.; HAYWARD, N. K.; KAY, G. F. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (VEGF-B) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature and impaired recovery from cardiac ischemia. **Circulation Research**, v. 86, n. 2, p. 29-35, Feb. 2000.

- BENELLI, U.; BOCCI, G.; DANESI, R.; LEPRI, A.; BERNARDINI, N.; BIANCHI, F.; LUPETTI, M.; DOLFI, A.; CAMPAGNI, A.; AGEN, C.; NARDI, M. TACCA, M. D. The heparan sulfate suleparioide inhibits rat corneal angiogenesis and in vitro neovascularization. **Experimental Eye Research**, v. 67, n. 2, p. 133-142, Aug. 1998.
- BIDUS, M. A.; WEBB, J. C.; SEIDMAN, J. D.; SCOTT ROSE, G.; BOICE, C. R.; ELKAS, J. C. Sustained response to bevacizumab in refractory well-differentiated ovarian neoplasms. **Gynecologic Oncology**, v. 102, n. 1, p. 5-7, Jul. 2006.
- BOCK, F.; ONDERKA, J.; DIETRICH, T.; BACHMANN, B.; KRUSE, F.; CURSIEFEN, C. Bevacizumab (Avastin[®]) as a potent inhibitor of inflammatory Hem- and lymphangiogenesis in the cornea, In: ARVO ANNUAL MEETING, 2006, FORTLAUDERDALE. **Resumos...** Rockville: Association for Research on Vision and Ophthalmology, 2006. Res. 3908.
- BROOKS, P. C.; MONTGOMERY, A. M. P.; ROSENFELD, M.; REISFELD, R. A.; HU, T.; KLIER, G.; CHERESH, D. A. Integrin alpha-v-beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1157-1164, Dec. 1994.
- CAMPOCHIARO, P. A.; First Arvo/Pfizer Institute Working Group. Ocular versus extraocular neovascularization: Mirror images or vague resemblances. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 2, p. 462-474, Feb. 2006.
- CAO, Y.; CAO, R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. **Nature**, v. 398, n. 6726, p. 381, Apr. 1999.
- CASEY, R.; LI, W. W. Factors controlling ocular angiogenesis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 124, n. 4, p. 521-529, oct. 1997.
- CHEN, W.; WAHL, S. M. Manipulation f TGF-beta to control autoimmune and chronic inflammatory diseases. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 15, p. 1367-1380, 1999.
- COMPERNOLLE, V.; BRUSSELMANS, K.; ACKER, T.; HOET, P.; TJWA, M.; BECK, H.; PLAISANCE, S.; DOR, Y.; KESHET, E.; LUPU, F.; NEMERY, B.; DEWERCHIN, M.; VAN VELDHoven, P.; PLATE, K.; MOONS, L.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. **Nature Medicine**, v. 8, n. 7, p. 702-710, 2002.
- COXON, A.; BOLON, B.; ESTRADA, J.; KAUFMAN, S.; SCULLY, S.; RATTAN, A.; DURYEA, D.; HU, Y. L.; REX, K.; PACHECO, E.; VAN, G.; ZACK, D.; FEIGE, U. Inhibition of interleukin-1 but not tumor necrosis factor suppresses neovascularization in rat models of corneal angiogenesis and adjuvant arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 10, p. 2604-2612, Oct. 2002.

CSAKY, K. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for neovascular age-related macular degeneration: promises and pitfalls. **Ophthalmology**, v. 110, n. 5, p. 879-881, May, 2003.

DANIELS, J. T.; GEERLING, G.; ALEXANDER, R. A.; MURPHY, G.; KHAW, P. T.; SAARIALHO-KERE. U. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases during wound healing of human corneal tissue. **Experimental Eye Research**, v. 77, n. 6, p. 653-664, Dec. 2003.

EDELMAN, J. L.; CASTRO, M. R.; WEN, Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, n. 6, p. 1112-1123, May, 1999.

EMMANOULIDES, C.; PEGRAN, M. ROBINSON, R.; HECHT, R.; ISACOFF, W. Anti-VEGF antibody bevacizumab (Avastin) with 5FU/LV as third line treatment for colorectal cancer. **Techniques in Coloproctology**, v. 8, supl. 1, p. s50-s52, Nov. 2004.

ENHOLM, B.; KARPANEN, T.; JELTSCH, M.; KUBO, H.; STENBACK, F.; PREVO, R.; JACKSON, D. G.; YLA-HERTTUALA, S.; ALITALO, K. Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor-c induces lymphangiogenesis in the skin. **Circulation Research**, v. 88, n.6, p. 632-329, Mar. 2004.

EYETECH STUDY GROUP. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. **Ophthalmology**, v. 110, n. 5, p. 979-986, May, 2003.

FECHINE-JAMACARU, F. V.; JUNIOR, J. U. F.; FILHO, M. O. M. Model of inflammatory angiogenesis in rabbit cornea induced by punctual alkaline cauterization. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 64-73, Jan. Feb. 2005.

FEINER, L.; BARR, E. E.; SHUI, Y. B.; HOLEKAMP, N. M.; BRANTLEY Jr, M. A. Safety of intravitreal injection of bevacizumab in rabbits eye. **Retina**, v. 26, n. 8, p. 882-888, Oct. 2006.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 4-25, Feb. 1997.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669-676, Jun. 2003.

FINI, M. E.; COOK, J. R.; MOHAN, R. Proteolytic mechanisms on corneal ulceration. **Archives of Dermatological Research**, v. 290, p. s12-s23, Jun.1998.

FINI, M. E.; PARKS, W. C.; RINEHART, W. B.; GIRAND, M. T.; MATSUBARA, M.; COOK, J. R.; WEST-MAYS, J. A.; SADOW, P. M.; BURGESSON, R. E.; JEFFREY, J. J.; KRUEGER, R. R.; ZIESKE, J. D. Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. **American Journal of Pathology**, v. 149, n. 4, Oct. 1996.

FOLKMAN, J.; KLAGSBURN, M.; SASSE, J.; WADZINSKI, M.; INGHER, D.; VLODAVSKY, I. A heparin-binding angiogenic protein bFGF is stored within basement membrane. **The American Journal of Pathology**, v. 130, n. 2, p. 393-400, Feb. 1988.

FOLKMAN, J.; SIHNG, Y. Angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, Jun. 1992.

FORRESTER, J. V.; DICK, A. D.; MCMENAMIN, P. G.; LEE, W. R. **The eye: basic sciences in practice**. 2. ed. Philadelphia. W.B. Saunders, 2002. 447 p.

FREDDO, J. **Avaliação do efeito da Ciclosporina A 0,2% tópica sobre a neovascularização em córnea de ratos após implante de membrana amniótica xenógena em microbolsa no estroma corneano**. 2003. 85 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GAN, L.; FAGERHOLM, P.; PALMBLAD, J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 82, n. 5, p. 557-563, Oct. 2004.

GAUDREAULT, J.; WEBB, W.; VAN HOY, M. Pharmacokinetics and retinal distribution of AMD rhufab V2 after intravitreal administration in rabbits. **AAPS PharmSci**, p. 3207, 1999. Supplement 1.

GERBER, H. P.; GERBER, H. P.; HILLAN, K. J.; RYAN, A. M.; KOWALSKI, J.; KELLER, G. A.; RANGELL, L.; WRIGHT, B. D.; RADTKE, F.; AGUET, M.; FERRARA, N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. **Development**, v. 126, n. 6, p. 1149-1159, Mar. 1999.

GRAGOUDAS, E. S.; ADAMIS, A. P.; CUNNINGHAM, E. T.; FEISOND, M.; GUYER, D. R. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 27, p. 2805-2816, Dec. 2004

GRUCHALA, M.; ROY, H.; BHARDWAI, S.; YLA-HERTTUALA, S. Gene therapy for cardiovascular diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 4, p. 407-423, 2004.

GUANDREAULT, J.; FEI, D.; RUSIT, J.; SUBOC, P.; SHIU, V. Preclinical pharmacokinetics of ranibizumab after a single intravitreal administration.

Investigative Ophthalmology and Visual Science, v. 46, n. 2, p. 726-733, Feb. 2005.

GUERRIERO, E.; YU, J. Y.; KAHOOK, M. Y.; SUNDARRAL, N.; SCUMAN, J. S.; NOECKER, R. J. Morphologic evaluation of bevacizumab (Avastin®) treatment corneal fibroblasts, In: ARVO ANNUAL MEETING, 2006, FORTLAUDERDALE. **Resumos...** Rockville: Association for Research on Vision and Ophthalmology, 2006. Res. 1642.

HEIER, J. S.; ANTOSZYK, A. N.; PAVAN, P. R.; LEFF, S. R.; ROSENFELD, P. J.; CIULLA, T. A.; DREYER, R. F.; GENTILE, R. C.; SY, J. P.; HANTSBARGER, G.; SHAMS, N. Ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, v. 113, n. 4, p. 633-642e4, Apr. 2006.

INOMATA, S.; MATSUNAGA, Y.; AMANO, S.; TAKADA, K.; KOBAYASHI, K.; TSUNENAGA, M.; NISHIYAMA, T.; KOHNO, Y.; FUKUDA, M. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 1, p. 128-134, Jan. 2003.

JANI, P. D.; SINGH, N.; BEHZADIAN, A.; CALDWELL, R.; FRANKLIN, T. Silver nitrate injury to mouse cornea induces MMPs and decreases sFit protein, but increases sFit genetic expression, In: ARVO ANNUAL MEETING, 2006, FORTLAUDERDALE. **Resumos...** Rockville: Association for Research on Vision and Ophthalmology, 2006. Res. 1648.

KABBINAVAR, F.; I.; MEROPOL, N. J.; LIEBERMAN, G.; GRIFFING, S.; BERGSLAND, E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/Leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 1, p. 60-65, Jan. 2003.

KAHOOK, M. Y.; SHUMAN, J. S.; NOECKER, R. J. Intravitreal bevacizumab in a patient with neovascular glaucoma. **Ophthalmic Lasers & Imaging**, v. 37, n. 2, p. 144-146, Mar. Apr. 2006.

KAHOOK, M. Y.; SHUMAN, J. S.; NOECKER, R. J. Needle bleb revision of encapsulated filtering bleb with bevacizumab. **Ophthalmic Lasers & Imaging**, v. 37, n. 2, p. 148-150, Mar. Apr. 2006.

KENYON, B.; VOEST, E.; CHEN, C.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J.; D'AMATO, R. A model of angiogenesis in the mouse cornea. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 37, n. 8, p. 1625-1632, Jul. 1996.

KIM, H. S.; SHANG, T.; CHEN, Z.; PFLUGFELDER, S. C.; LI, D. Q. TGF-beta1 stimulates production of gelatinase (MMP-9) collagenase (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. **Experimental Eye Research**, v. 79, n. 2, p. 263-274, Aug. 2004.

KING, G. L.; GODMAN, A. D.; BUZNEY, S.; MOSES, A.; KAHN, C. R. Receptors and growth-promoting effects of insulin-like growth factor on cells from bovine retinal capillaries and aorta. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, p. 1028-1036, 1985.

KITAMOTO, Y.; TOKUNAGA, H.; TOMITA, K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 10, p. 2351-2357, May. 1997.

KNIGHTON, D. R.; PHILLIPS, G. D.; FIEGEL, V. D. Wound healing angiogenesis: indirect stimulation by Basic Fibroblastic Growth Factor. **The Journal of Trauma**, v. 30, n. 12, p. S134-S140, 1990.

KROLL, J.; WALTENBERGER, J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR), rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, n. 3, p. 636-699, Nov. 1999.

KUSANO, K.; MIYAURA, C.; INADA, M.; TAMURA, T.; ITO, A.; NUGASE, H.; KAMOI, K.; SUDA, T. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. **Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 1338-1345, Apr. 1998.

KVANTA, A.; SARMAN, S.; FAGERHOLM, P.; SEREGARD, S.; STEEN, B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. **Experimental Eye Research**, v. 70, n. 4, p. 419-428, Apr. 2000.

KWAK, D. H.; KIM, J. K.; KIM, J. Y.; JEONG, H. Y.; KEUM, K. S.; HAN, S. H.; RHO, Y.; WOO, W. H.; JUNG, K. Y.; CHOI, B. K.; CHOO, Y. K. Anti-angiogenic activities of *Cnidium officinale* Makino and *Tabanus bovinus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 3, p. 373-379, Aug. 2002.

KWON, Y. S.; KIM, J. C. Inhibition of corneal neovascularization by rapamycin. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 38, n. 2, p. 173-179, Apr. 2006.

LAINER, D. T.; BRAHN, E. New antiangiogenic strategies for the treatment of proliferative synovitis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 14, n. 1, p. 1-17, Jan. 2005.

LIU, Y.; CAO, J.; RENARD, R. A.; SONG, H.; HYLTON, H.; RUDGE, J. S.; PAPADOPOULOS, N.; YANCOPOULOS, G. D.; WIEGAND, S. J. Low dose, subconjunctival administration of VEGF trap inhibits suture-induced corneal neovascularization and inflammation, In: ARVO ANNUAL MEETING, 2006, FORTLAUDERDALE. **Resumos...** Rockville: Association for Research on Vision and Ophthalmology, 2006. Res. 1626.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, R. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p.265–275, Nov.1951.

MACUGEM DIABETIC RETINOPATHY STUDY GROUP. Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. **Ophthalmology**, v. 113, n. 1, p. 23-28, Jan. 2006.

MATSUBARA, M.; ZIESKE, J. D.; FINI, M. E. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. v. 32, n. 13, p. 3221-3227, Dec. 1991.

MCCARTNEY, F. N.; WAHL, S. M. Transforming growth factor-beta: a matter of life and death. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, p. 401-409, 1994.

McCLELLAN, S. A.; HUGAN, X.; BARRETT, R. P.; LIGHVANI, S.; ZHANG, Y.; RICHIERT, D.; HAZLETT, L. D. Matrix metalloproteinase-9 amplifies the immune response to *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. v. 47, n. 1, p. 256-264, Jan. 2006.

MICHELS, S.; ROSENFELD, P. J.; PULIAFITO, C. A.; MARCUS, E. N.; VENKATRAMAN, A. S. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, v. 112, n. 6, p. 1035-1047, Jul. 2005.

MIMURA, T.; AMANO, S.; USUI, T.; KAJI, Y.; OSHIKA, T.; ISHII, Y. Expression of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in corneal lymphangiogenesis. **Experimental Eye Research**, v. 72, n.1, p. 71-78, Jan. 2001.

MOSES, M. A. The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Stem Cells**, v. 14, n. 3, p. 180-189, 1997.

NAGY, J. A.; VASILE, E.; FENG, D.; SUNDBERG, C.; BROWN, L. F.; DETMAR, M. J.; LAWITTS, J. A.; BENJAMIN, L.; TAN, X.; MANSEAU, E. J.; DVORAK. A. M.; DVORAK H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 11, p. 1497-1506, Dec, 2002.

NASH, A. D.; BACA, M.; WRIGHT, C.; SCOTNEY, P. D. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, n. 1, p. 61-69, Apr. 2006.

PEREIRA, E. R. **Influência nervosa e hormonal na evolução de vasos neoformados na córnea de ratos**. 1996. 111 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

PETRI, G. **Influência da aplicação tópica da proteína ligante de cálcio MRP-14 na evolução da neovascularização induzida na córnea de ratos.** 1997. 61 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

POLVERINI, P.; COTRAN, R.; GIMBRONE, M.; UNANUE, E. Activated macrophages induce vascular proliferation. **Nature**, v. 269, n. 5631, p. 804-806, 1977.

REN, M.; MANZANO, R. P. A.; PEYMAN, G. A.; KHAN, P.; CARVOUNIS, P.; KIVILCIM, M. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by bevacizumab, In: ARVO ANNUAL MEETING, 2006, FORTLAUDERDALE. **Resumos...** Rockville: Association for Research on Vision and Ophthalmology, 2006. Res. 1638.

RODRIGUES, L. C. S. **Avaliação do papel da conexina 43 na angiogênese, experimentalmente induzida em córnea de camundongos.** 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ROSENFELD, P. J.; HEIER, J. S.; HANTSBARGER, G.; SHAMS, N. Tolerability and efficacy of multiple escalating doses of ranibizumab (Lucentis) for neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, v. 113, n. 4, p. 623-632.e1, Apr. 2006.

ROSENFELD, P. J.; SCHWARTZ, S. D.; BLUMENKRANZ, M. S.; MILLER, J. W.; HALLER, J. A.; REIMANN, J. D.; GREENE, W. L.; SHAMS, N. Maximum tolerated dose of a humanized anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment for treating neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, v. 112, n. 6, p. 1048-1053, Jun. 2005.

ROSIN, A. M.; MICHELS, S.; GEITZNAUER, W.; PRAGER, F.; SCHIMDT-ERFURTH, U. VEGF 165 serum levels following systemic bevacizumab (Avastin®) therapy for neovascular age-related macular degeneration, In: ARVO ANNUAL MEETING, 2006 FORTLAUDERDALE. **Resumos...** Rockville: Association for Research on Vision and Ophthalmology, 2006. Res. 2173.

ROY, H.; BHARDWAJ, S.; YLA-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS Letters**, v. 580, n. 12, p. 2879-2887, May. 2006.

SAFATLE, A. M. V. **Estudo comparativo da capacidade angiogênica do pericárdio equino e da membrana amniótica de equino em córnea de ratos.** 1998. 92 f. (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SALESI, N.; BOSSONE, G.; VELTRI, E.; DI COCCO, B.; MAROLLA, P.; PACETTI, U.; LAROSA, G.; MUNI, R.; VECCHIONE, A. Clinical experience with bevacizumab in colorectal cancer. **Anticancer Research**, v. 25, n. 5, 3619-3923, Sep./Oct. 2005.

SCAPPATICCI, F. A.; FEHRENBACHER, L.; CARTWRIGHT, T.; HAINSWORTH, J. D.; HEIM, W.; BERLIN, J.; KABBINAVAR, F.; NOVOTNY, W.; SARKAR, S.; HURWITZ, H. Surgical healing complications in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. **Journal of Surgical Oncology**, v. 91, n. 3, p. 173-180, Sep. 2005.

SCHULTZ, G.; KHAW, P. T.; OXFORD, K.; MACAULEY, S.; VAN SETTEN, G.; CHEGINI, N. Growth factors and ocular wound healing. **Eye**, v. 8, p. 184-187, 1994.

SEO, K.; CHOI, J.; PARK, M.; RHEE, C. Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. **Journal of Veterinary Science**, v. 2, n. 2, p. 125-130, Aug. 2001.

SINGH, N.; MACNAMARA, E.; RASHID, S.; AMBATI, J.; KONTOS, C. D.; HIGGINS, E.; AMBATI, B. K. Systemic soluble Tie2 expression inhibits and regresses corneal neovascularization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 332, n. 1, p. 194-199, Jun. 2005.

SIVAK, J. M.; FINI, M. E. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, n.1, p. 1-14, Jan. 2002.

STUART, P. M.; PAN, F.; PLAMBECK, S.; FERGUSON, T. A. FasL-Fas interactions regulate neovascularization in the cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 1, p. 93-98, Jan. 2003.

SUTO, K.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T.; MIZUNO, H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) from snake venoms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 3, p. 2126-2131, Jan. 2005.

SWANK, A.; HOSGOOD, G. Corneal wound healing and the role of growth factors. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 18, n. 9, p. 1007-1017, 1996.

TUCKER, C. E.; CHEN, L. S.; JUDKINS, M. B.; FARMER, J. A.; GILL, S. C.; DROLET, D. W. Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Science Applications**, v. 732, n. 1, p. 203-212, Sep. 1999.

VOSSELER, S.; MIRANCEA, N.; BOHLEN, P.; MUELLER, M. M.; FUSENING, N. E. Angiogenesis inhibition by vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade reduces stromal matrix metalloproteinases expression, normalizes stromal tissue and reverts epithelial tumor phenotype in surface heterotransplants. **Cancer Research**, v. 65, n. 4, p. 1294-1305, Feb. 2005.

VU, T. H.; WERB, Z. Gelatinase B: structure, regulation and function. In: PARKS, W. C.; MECHAN, R. P. **Matrix Metalloproteinaes**. 1. ed. San Diego, Academic Press, 1998, p. 115-148.

WAGNER, S.; FUELLER, T.; HUMMEL, V.; RIECHMENN, P.; TONN, J. C. Influence of vegfr-2 inhibition on mmp secretion and motility of microvascular cerebral endothelial cells. **Journal of Neurooncology**, v. 62, n. 3, p. 221-231, May, 2003.

WAHL, S. M. Transforming growth factor: the good, the bad and the ugly. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 1587-1590, 1994.

WEDAN, S. B.; LOW, J. A.; YANG, S. X.; CHOW, C. K.; CHOYKE, P.; DANFORTH, D.; HEWITT, S. M.; BERMAN, A.; STEINBERG, S. M.; LIEWEHR, D. J.; PLEHN, J.; DOSHI, A.; THOMASSON, D.; MCCARTHY, N.; KOEPPEN, H.; SHERMAN, M.; ZUJEWSKI, J.; CAMPHAUSEN, K.; CHEN, H.; SWAIN, S. M. Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 5, p. 769-777, Feb. 2006.

WITMER, A. N.; VRENSSEN, G. F. J. M.; VAN NOORDEN, C. J. F.; SCHLINGEMANN, R. O. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, n. 1, p. 1-29, Jan. 2003.

ZHANG, H.; LI, C.; BACIU, P. C. Expression of integrins and MMPs during alkaline-burn –induced corneal angiogenesis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 43, n. 4, p. 955-962, Apr. 2002.