

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

JOÃO CRISPIM MORAES LIMA RIBEIRO

**POTENCIAL EFEITO INIBITÓRIO DO
LASSBIO-596, UM ANÁLOGO DA TALIDOMIDA,
NA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA EM CÓRNEA DE COELHO**

**FORTALEZA
2011**

JOÃO CRISPIM MORAES LIMA RIBEIRO

**POTENCIAL EFEITO INIBITÓRIO DO
LASSBIO-596, UM ANÁLAGO DA TALIDOMIDA,
NA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA EM CórNEA DE COELHO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru.

**FORTALEZA
2011**

JOÃO CRISPIM MORAES LIMA RIBEIRO

**POTENCIAL EFEITO INIBITÓRIO DO
LASSBIO-596, UM ANÁLAGO DA TALIDOMIDA,
NA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA EM CórNEA DE COELHO**

Dissertação submetida à
Coordenação do Programa de
Pós-Graduação *Stricto Sensu*
em Cirurgia da Universidade
Federal do Ceará como requisito
parcial para obtenção do Grau
de Mestre em Cirurgia.

Aprovada em 10 / 09 / 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)
(Orientador)

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru
Universidade Federal do Ceará (UFC)
(Co-orientador)

Profa. Dra. Nilva Simeren Bueno de Moraes
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)
Escola Paulista de Medicina (EPM)

Aos meus pais, Demócrito Gonçalves Lima Ribeiro e Maria Socorro Moraes Ribeiro, defensores incondicionais da melhor educação como semente de um futuro digno e honesto, e a minha esposa, Lyana, admirável pelo caráter inspirador e amável por todo o carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Manoel Odorico de Moraes Filho, que desde a época em que pertenci a faculdade de medicina da UFC como acadêmico, onde o tive também como professor, mostrou ser pessoa fortemente dedicada ao meio científico, tendo de uma forma impressionante aceito em ser orientador deste projeto. Sou imensamente grato por todo o apoio dado, sempre.

Ao grande e insubstituível co-orientador, Professor Doutor Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru, que ao conhecê-lo em sua sala perfeitamente designada, dentro de uma unidade de farmacologia clínica com os fundos dando acesso à sua fonte de inspiração: o laboratório experimental, demonstrou ser a pessoa que até hoje é: genial. Como se não bastasse, no decorrer do percurso, foi capaz de demonstrar ser um grande mestre. Obrigado por tudo.

À Professora Doutora Nilva Simeren Bueno de Moraes (UNIFESP/EPM), oftalmologista, profissional destaque na minha formação como oftalmologista, de personalidade única e imprescindível no Departamento de Oftalmologia da UNIFESP. Uma honra sua participação na banca de defesa desta dissertação.

À colaboração do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da UFRJ, em nome da Professora Doutora Lídia Moreira Lima e do Professor Doutor Eliezer Barreiro por terem cedido o composto fonte de tal estudo.

À Professora Doutora Nágila Ricardo, do Departamento de Química da UFC, pela imensa ajuda no processo de solubilização dos fármacos.

À Professora Doutora Conceição Aparecida Dorneles pelas preciosas colocações durante o exame de qualificação e conselhos inesquecíveis durante a execução deste projeto.

Ao Professor Doutor Sérgio Botelho Guimarães pela honra em ter participado do exame de qualificação com importante colaboração.

Aos amigos, colegas de profissão, Manoel Bonfim Neto e Antônio Felipe Simão pelo incentivo na execução de tal desafio.

À minha irmã Mariana Zaíra Moraes Lima Ribeiro, acadêmica de medicina, por toda a ajuda, companheirismo e dedicação durante toda a execução deste trabalho.

Ao meu irmão Luís Carlos Moraes Lima Ribeiro pelo apoio e incentivo dado em todo o decorrer do projeto.

Às Senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes, secretárias do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, por toda a dedicação e competência com que trabalham.

À Senhora Adelânia Roque Marinho Guedes, secretária do Laboratório de Oncologia Experimental, por todo o apoio dado e competência demonstrada em seu trabalho.

Ao Senhor Bento Francisco de Oliveira, técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental, pelos cuidados com os animais e apoio em momentos cruciais do experimento.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia por todos os ensinamentos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia que de alguma forma estimularam a execução deste estudo.

**“Algo só é impossível até
que alguém duvide e resolva
provar o contrário.”**

Albert Einstein

RESUMO

POTENCIAL EFEITO INIBITÓRIO DO LASSBIO-596, UM ANÁLOGO DA TALIDOMIDA, NA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA EM CÓRNEA DE COELHO. JOÃO CRISPIM MORAES LIMA RIBEIRO. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho. Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru.

Diversos mecanismos reguladores de angiogênese alteram-se propiciando processos fisiológicos assim como a propagação de doenças. Observa-se exacerbação do processo angiogênico em diversas patologias, entre elas podendo ser citada a neovascularização de córnea. Para o tratamento dessas doenças, são estudados diversos fármacos com propriedades antiangiogênicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia do fármaco LASSBIO-596, estruturalmente designado como um híbrido da talidomida, sildenafil e arilsulfonamida, na angiogênese corneana inflamatória. Dezoito coelhos foram submetidos a uma cauterização alcalina na córnea direita. Os animais foram randomicamente alocados em três grupos: veículo, dexametasona e LASSBio-596. As drogas foram administradas em forma de colírio três vezes por dia durante 21 dias. Avaliações foram realizadas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 pós-cauterização. Nesses momentos, imagens digitalizadas da córnea foram capturadas de uma forma padronizada. A resposta angiogênica foi mensurada utilizando-se um software que foi desenvolvido especificamente para esta finalidade. Foram calculados os seguintes parâmetros: área de neovascularização (AN), comprimento vascular total (CT) e número de vasos sanguíneos (NV). Observou-se que a dexametasona diminuiu significativamente AN, CT e NV durante todas as avaliações. Portanto, a dexametasona inibiu completamente a angiogênese inflamatória da córnea com uma taxa de angiogênese (TA) de $-0,001 \pm 0,006 \text{ mm}^2/\text{dia}$, que foi significativamente menor ($p < 0,001$) do que a observada após o tratamento com o veículo e LASSBio-596 ($0,078 \pm 0,024 \text{ mm}^2/\text{dia}$). Apesar de o LASSBio-596 ter reduzido o processo de angiogênese mais do que o veículo, essa diferença não foi estatisticamente significante. No entanto, verificou-se que a TA medida no grupo LASSBio-596 foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que a observada nos animais controle, indicando um potencial efeito antiangiogênico. Concluímos que a aplicação tópica de LASSBio-596 a 1,0% tem um potencial efeito inibitório sobre a angiogênese corneana inflamatória em coelhos.

PALAVRAS-CHAVE: Neovascularização da Córnea. Inflamação. Talidomida. Inibidores da angiogênese.

ABSTRACT

POTENCIAL INHIBITORY EFFECT OF LASSBIO-596, A THALIDOMIDE ANALOGUE, ON INFLAMMATORY CORNEAL ANGIOGENESIS IN RABBITS. JOÃO CRISPIM MORAES LIMA RIBEIRO. Dissertation (Master). Post-Graduation Program (*Stricto Sensu*) in Surgery. Federal University of Ceara. Supervisor: Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, MD., PhD. Co-Supervisor: Prof. Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru, MD., PhD.

Several regulatory mechanisms of angiogenesis provide alter physiological processes and the spread of diseases. There is exacerbation of the angiogenic process in various diseases, especially in corneal neovascularization. For the treatment of these diseases, several drugs were studied with antiangiogenic properties. The aim of this study was to evaluate the effect of LASSBio-596, structurally designed as a hybrid of thalidomide, sildenafil and arilsulfonamide, on inflammatory corneal angiogenesis. Eighteen rabbits were submitted to an alkaline cauterization in the right cornea. The animals were randomly allocated in three groups: vehicle, dexamethasone, and LASSBio-596 group. Drugs were administrated by eye drops three times per day for 21 days. Evaluations were performed on days 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 21 post-cauterization. At these time points, digital images of the cornea were captured in a standard fashion. Angiogenic response was measured using software that was developed specifically for this purpose. It calculated the following parameters: neovascularization area (NA), total vascular length (TVL), and blood vessel number (BVN). It was observed that dexamethasone significantly decreased NA, TVL, and BVN during all assessments. Therefore, dexamethasone completely inhibited the inflammatory corneal angiogenesis with angiogenesis rate (AR) of -0.001 ± 0.006 mm²/day, which was significantly lower ($p < 0.001$) than that observed after treatment with vehicle and LASSBio-596 (0.078 ± 0.024 mm²/day). Although LASSBio-596 reduced angiogenesis more than did vehicle, this difference was not statistically significant. However, it was found that the AR as measured in the LASSBio-596 group was significantly lower ($p < 0.05$) than that seen in control animals, indicating a potential antiangiogenic effect. We conclude that topical application of LASSBio-596 at 1.0% has a potential inhibitory effect on inflammatory corneal angiogenesis in rabbits.

KEYWORDS: Corneal Neovascularization. Inflammation. Thalidomide. Angiogenesis Inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Córnea humana. Sua transparência e ausência de vasos sanguíneos e linfáticos são pré-requisitos essenciais para manutenção do eixo visual em condições normais.22
- FIGURA 2** – Neovascularização corneana secundário ao uso inadequado e prolongado de lentes de contato.23
- FIGURA 3** – Representação esquemática e simplificada do processo de neovascularização da córnea.26
- FIGURA 4** - Representação esquemática e simplificada do mecanismo de ação da talidomida.28
- FIGURA 5** – Estruturas químicas da Talidomida, seu metabólito e do LASSBio-596, evidenciando o processo de hibridização molecular.30
- FIGURA 6** – Preparação dos colírios experimentais.35
- FIGURA 7** – Colírios experimentais.36
- FIGURA 8** – Posicionamento do coelho em decúbito lateral esquerdo (A). Aposição de campos (B) e colocação do blefarostato graduável, expondo a córnea e a região límbica superior (C). Posicionamento da peça circular de papel de filtro a 1 mm do limbo corneoescleral (D).37
- FIGURA 9** – Peça de papel de filtro posicionada na periferia superior da córnea direita (A); aspecto da lesão resultante (B).38
- FIGURA 10** – Instilação do colírio em saco conjuntival de córnea já cauterizada.39

FIGURA 11 – Delineamento do estudo, dando ênfase ao início e fim do tratamento, fim da observação e aos sete dias de avaliação.	39
FIGURA 12 – Imagens capturadas em diferentes fases do processo angiogênico.	41
FIGURA 13 – Sistema de Quantificação de Angiogênese – SQAN.	42
FIGURA 14 – Demarcação de região de interesse.	42
FIGURA 15 – Cálculo da área de neovascularização.	43
FIGURA 16 – Cálculo do comprimento vascular total.	43
FIGURA 17 – Aspecto da resposta angiogênica verificada no grupo Veículo nos dias 3, 9, 15 e 21 após a cauterização.	45
FIGURA 18 – Aspecto da resposta angiogênica verificada no grupo Dexametasona nos dias 3, 9, 15 e 21 após a cauterização.	46
FIGURA 19 – Aspecto da resposta angiogênica verificada no grupo LASSBio-596 nos dias 3, 9, 15 e 21 após a cauterização.	47
FIGURA 20 – Quantificação da resposta angiogênica nos grupos Veículo, Dexametasona e LASSBio-596 conforme a variável área de neovascularização (AN).	48
FIGURA 21 – Quantificação da resposta angiogênica nos grupos Veículo, Dexametasona e LASSBio-596 conforme o parâmetro comprimento vascular total (CT).	49
FIGURA 22 – Quantificação da resposta angiogênica nos grupos Veículo, Dexametasona e LASSBio-596 conforme o parâmetro número de vasos sanguíneos (NV).	50

FIGURA 23 – Taxa média de angiogênese (TA), em mm^2/dia , referente ao período entre os dias 3 e 21, calculada nos grupos Veículo, Dexametasona e LASSBio-596.51

FIGURA 24 – Taxa média de angiogênese (TA), em mm^2/dia , referente ao período entre os dias 3 e 12 e ao intervalo entre o 12^o e 21^o dia, calculada nos grupos Veículo, Dexametasona e LASSBio-596.52

FIGURA 25 – Eficácia final dos tratamentos com Dexametasona e LASSBio-596, expressa em termos percentuais, calculada em função dos dados do grupo Veículo no 21^o dia do experimento.53

Figura 26 – Representação esquemática e simplificada do mecanismo de ação dos glicocorticóides.56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN - área de neovascularização

ANOVA - análise de variância

AR - *angiogenesis rate*

BVN - *blood vessel number*

CCD - dispositivo de carga acoplada

CEPA - Comissão de Ética em Pesquisa Animal

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX-2 - cicloxigenase-2

CT - comprimento vascular total

DMSO - dimetilsufóxido

DMRI - degeneração macular relacionado à idade

EF - Eficácia terapêutica

FGF-2 - fator de crescimento de fibroblastos 2

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular 1

IL - interleucina

IL-1Ra - antagonista do receptor de IL-1

LABCEX - Laboratório de Cirurgia Experimental

LASSBio[®] - Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas

LPS - lipopolissacarídeo

M - Molar

MMP-2 - metaloproteinase da matriz-2

NA - *neovascularization area*

NaOH - hidróxido de sódio

NF- κ β - fator nuclear *kappa* β

NO - óxido nítrico

NV - número de vasos sanguíneos

PA - ativador do plasminogênio

PAI-1 - inibidor do ativador do plasminogênio-1

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

PIGF - fator de crescimento da placenta

PNM - polimorfonuclear

SQAN - Sistema de Quantificação de Angiogênese

TA - taxa de angiogênese

TGF- β 1 - fator de crescimento transformador beta-1

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TSP-2 - trombospondina-2

TVL - *total vascular length*

UFC - Universidade Federal do Ceará

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-1 - receptor do VEGF 1

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Angiogênese: conceito, mecanismos e implicações clínicas	16
1.2 Ensaios de angiogênese em córnea	21
1.3 Neovascularização corneana: aspectos fisiopatológicos.....	22
1.4 Talidomida.....	27
1.5 LASSBio-596: um análogo da talidomida.....	29
1.6 Relevância e justificativa	32
2 OBJETIVOS	33
2.1 Geral	33
2.2 Específicos.....	33
3 MÉTODO	34
3.1 Animais.....	34
3.2 Colírios experimentais.....	34
3.3 Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho.....	36
3.4 Desenho experimental.....	38
3.5 Procedimento de captura das imagens.....	40
3.6 Método de quantificação de angiogênese.....	41
3.7 Análise estatística	44
4 RESULTADOS	45
5 DISCUSSÃO	54
5.1 Considerações finais.....	60
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS	62
ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Angiogênese: conceito, mecanismos e implicações clínicas

A formação de novos vasos sanguíneos envolve dois processos fundamentais: vasculogênese e angiogênese (RISAU, 1997). Vasculogênese é a formação primária de vasos sanguíneos a partir dos precursores da célula endotelial, os angioblastos (HANAHAN, FOLKMAN, 1996). Já o processo de desenvolvimento de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes é denominado de angiogênese ou neovascularização (HANAHAN, FOLKMAN, 1996; AUERBACH *et al.*, 2003).

Os vasos recém-formados pelo mecanismo de angiogênese são constituídos apenas de células endoteliais. O fortalecimento das adesões entre as células endoteliais e o recrutamento de células murais, pericitos e células musculares lisas são necessários para promover a estabilização e maturação desses neovasos. Esse processo é chamado de arteriogênese. O estabelecimento de fluxo sanguíneo no vaso neoformado constitui também um fator essencial para a maturação vascular. Quando, porém, o estímulo angiogênico é insuficiente, o nevaso torna-se frágil, dilatado, sujeito a rupturas e sangramentos, resultando na redução do fluxo e, finalmente, na sua regressão (CARMELIET, 2000).

A angiogênese normal ou fisiológica ocorre, principalmente, durante o desenvolvimento embrionário (PAPETTI; HERMAN, 2002). É observada, porém, ao longo da vida adulta, em alguns eventos fisiológicos, tais como: ovulação, ciclo endometrial, desenvolvimento da placenta e reparação de feridas (FOLKMAN, 1995; RISAU, 1997; PAPETTI; HERMAN, 2002). Dessa forma, a angiogênese é essencial para o processo de reprodução, desenvolvimento e reparação. Nessas condições, a resposta angiogênica é limitada e rigorosamente controlada, de modo que é ativada por um breve período, sendo, em seguida, completamente inibida (FOLKMAN; SHING, 1992), no momento em que as demandas metabólicas do tecido em crescimento foram atendidas pela rede vascular neoformada (PAPETTI; HERMAN, 2002).

O controle da angiogênese é feito por um fino balanço entre fatores endógenos promotores (angiogênicos) e inibidores (angiostáticos) (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; CONTI, 2002). De fato, exceto nas condições fisiológicas enumeradas anteriormente, a célula endotelial do organismo adulto sadio apresenta um tempo de *turnover* muito longo (MALONNE *et al.*, 1999), que pode exceder 1.000 dias (FOLKMAN, 1995). Durante a angiogênese, porém, o tempo médio de *turnover* é de 5 dias (FOLKMAN; SHING, 1992). Dessa forma, ao longo de quase toda sua existência, a célula endotelial permanece fora do ciclo celular, num estado quiescente, embora mantenha a capacidade de proliferar (FOLKMAN, 1995).

A manutenção da célula endotelial no estado quiescente decorre da ação de reguladores endógenos negativos, uma vez que reguladores positivos são detectados, com frequência, em tecidos adultos nos quais não se observa angiogênese. Por outro lado, reguladores positivos e negativos frequentemente coexistem em tecidos nos quais a célula endotelial está ativada (PEPPER, 1997).

Diversos fatores de crescimento e citocinas estão envolvidos na regulação da angiogênese. Dentre os agentes indutores de angiogênese, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) são considerados os mais importantes (CONTI, 2002).

Os efeitos biológicos do VEGF podem ser assim enumerados: VEGF estimula a migração e proliferação da célula endotelial vascular; inibe a apoptose da célula endotelial; aumenta a permeabilidade vascular, mediada pelo óxido nítrico (NO); estimula a produção, pela célula endotelial, de ativadores do plasminogênio (uPA e tPA), do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) e da colagenase intersticial (FERRARA, 2001; PAPETTI; HERMAN, 2002; FERRARA, 2004).

Os inibidores endógenos da angiogênese podem ser divididos em quatro grupos: interferons, fragmentos proteolíticos, interleucinas (IL) e inibidores de proteases (PAPETTI; HERMAN, 2002). Na família dos interferons, destacam-se o interferon- α e interferon- β , os quais diminuem a expressão de FGF-2 e VEGF (CARMELIET, 2000). Dentre as interleucinas, IL-4 e IL-12 são inibidoras da proliferação da célula endotelial. Os inibidores de proteases impedem a remodelação da matriz extracelular, tornando-a desfavorável para a

migração, adesão e formação de tubos pela célula endotelial (PAPETTI; HERMAN, 2002). Diversos agentes antiangiogênicos potentes constituem, de fato, fragmentos de proteínas maiores, as quais carecem de atividade inibitória. A maioria desses produtos de clivagem deriva de componentes da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina, ou de enzimas como plasminogênio e metaloproteinase da matriz-2 (MMP-2) (PAPETTI; HERMAN, 2002). Os dois principais membros dessa classe são a angiostatina e a endostatina.

Em condições patológicas, os diversos mecanismos reguladores do processo angiogênico alteram-se para propiciar a propagação da doença, como se observa, por exemplo, durante a angiogênese tumoral (PAPETTI; HERMAN, 2002). Nesses casos, a angiogênese anormal, seja excessiva ou deficiente, contribui, sobremaneira, para a patogênese de uma série de doenças que inclui desordens inflamatórias, infecciosas, imunológicas, isquêmicas e malignas: as chamadas doenças dependentes de angiogênese (FOLKMAN, 1995). Entre as afecções em que se observa exacerbação do processo angiogênico, podem ser citadas: artrite reumatóide, sinovite, psoríase, dermatite alérgica, sarcoma de Kaposi, hemangiomas, aterosclerose, obesidade, retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, retinopatia da prematuridade, glaucoma neovascular, neovascularização corneana, rejeição de transplante de córnea, asma, pólipos nasais, doença intestinal inflamatória, endometriose, crescimento tumoral e metastático (FOLKMAN, 1995; ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999; CROMER *et al.*, 2011). Outras doenças ou condições decorrem, por outro lado, de uma angiogênese insuficiente ou uma regressão vascular anormal, entre as quais: úlcera gástrica e duodenal, úlcera cutânea crônica, queda de cabelo, retardo na consolidação óssea, osteoporose, pré-eclâmpsia, isquemia cerebral, miocárdica e periférica (FOLKMAN, 1995).

Algumas evidências sugerem a existência de mecanismos de controle distintos para a angiogênese patológica observada no organismo adulto e a angiogênese fisiológica do período embrionário, embora estas aparentes diferenças possam refletir a ainda incompleta compreensão do processo angiogênico. Entre as moléculas com mínimo envolvimento no desenvolvimento da rede vascular embrionária, mas que afetam substancialmente a angiogênese patológica, incluem-se: cicloxigenase-2 (COX-

2), fator de crescimento da placenta (PIGF), integrina- α V β 3, inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), NO e trombospondina-2 (TSP-2). Outra diferença entre angiogênese fisiológica e patológica diz respeito ao fato de que esta última é frequentemente induzida pela inflamação. Assim, monócitos/macrófagos, mastócitos, plaquetas e outros leucócitos são atraídos para os locais de inflamação ou de reparação de ferida, sendo que fatores angiogênicos, como VEGF, contribuem em parte na promoção dessa quimiotaxia. Tais células produzem então fatores angiogênicos, como VEGF, FGF-2, fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1), IL-8, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), proteína quimiotática de monócitos-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), proteinases, que, por sua vez, atraem células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, leucócitos e plaquetas (CARMELIET, 2000). Sabe-se também papel de outras moléculas na fisiopatologia da angiogênese, especialmente das proteínas da família CCN, como a CCN5 (RUSSO; CASTELLOT JR, 2010) além de complexa rede de sinais mediada pelos receptores acoplados a proteína G fosfato-esfingosina-1 na vasculogênese, particularmente com ênfase nas respostas de adesão e motilidade da célula endotelial vascular (ARGRAVES; WILKERSON; ARGRAVES, 2010).

Os avanços alcançados ao longo dos anos acerca da compreensão dos mecanismos moleculares e celulares do processo angiogênico possibilitaram o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para combater as doenças dependentes de angiogênese. De um lado está a angiogênese terapêutica, isto é, a possibilidade do uso clínico de fatores pró-angiogênicos naquelas situações onde a angiogênese é insuficiente, como nas doenças isquêmicas (SCHUMACHER *et al.*, 1998). O objetivo é restaurar e manter a perfusão tecidual pela estimulação da angiogênese no território isquêmico (PEPPER, 1997). Do outro lado, destaca-se a aplicação clínica de agentes antiangiogênicos naquelas condições caracterizadas por angiogênese excessiva, principalmente o câncer, ou seja, a terapia antiangiogênica (PEPPER, 1997, GASPARINI *et al.*, 2005).

Vários ensaios clínicos avaliaram ou estão avaliando a eficácia de diversos inibidores de angiogênese, especialmente no que se refere à terapia anticâncer. Os relatos preliminares sugerem que a terapia antiangiogênica com

um único agente é pouco eficaz em tumores avançados (GASPARINI *et al.*, 2005). Por outro lado, a combinação da terapia antiangiogênica com a quimioterapia convencional parece mais promissora. Além disso, encontra-se aprovado pelo FDA (departamento americano responsável pelo controle de alimentos e medicamentos) terapias anticâncer, especialmente para carcinoma de células renais avançado, baseado em recentes avanços no desenvolvimento de novas terapias antiangiogênica, como sorafenib, sunitinib e pazopanib, que são inibidores da tirosina quinase dos receptores de VEGF (VEGFR-1, -2 e -3) (BHARGAVA; ROBINSON, 2011), ampliando o arsenal terapêutico antiangiogênico.

O advento dos fármacos antiangiogênicos também proporcionou novas opções terapêuticas para as doenças oftalmológicas dependentes de angiogênese, sobretudo a forma neovascular da degeneração macular relacionado à idade (DMRI) (WIJNGAARDEN; COSTER; WILLIAMS, 2005). Em tal doença, estudos demonstraram claros benefícios com o tratamento, por via intravítrea, com os seguintes inibidores de VEGF: pegaptanib, um aptâmero de ácido ribonucleico com 28 bases nitrogenadas (oligonucleotídeo), que se liga e bloqueia especificamente a isoforma VEGF₁₆₅ (GRAGOUDAS *et al.*, 2004); ranibizumab, um fragmento de anticorpo monoclonal anti-VEGF, que inibe a atividade de todas as isoformas do VEGF (FERRARA *et al.*, 2006); e bevacizumab, um anticorpo monoclonal humanizado de cadeia completa contra a molécula do VEGF, inibindo VEGFR-1 e -2 (AVERY *et al.*, 2006). Recentemente, um grande estudo multicêntrico, prospectivo e randomizado comparou o uso de bevacizumab e ranibizumab para DMRI e demonstrou que o uso mensal de bevacizumab e ranibizumab resultou na mesma acuidade visual final (The CATT Research Group, 2011).

Entretanto, apesar de alguns resultados promissores, persiste o desafio de aprofundar o conhecimento das bases moleculares das doenças dependentes de angiogênese, notadamente o câncer, de modo a propiciar o desenvolvimento de terapias antiangiogênicas mais eficazes e seguras.

1.2 Ensaio de angiogênese em córnea

No intuito de se estudar experimentalmente o processo de formação dos vasos sanguíneos, um dos modelos mais utilizados é o ensaio de angiogênese em córnea (TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004). Nesse modelo, um estímulo artificialmente induzido na córnea promove uma resposta angiogênica, principalmente pelo mecanismo de brotamento, caracterizada pelo crescimento de neovasos, derivados do plexo vascular límbico, no estroma corneano, em direção ao local do estímulo angiogênico (HASAN *et al.*, 2004). É considerado um dos melhores ensaios *in vivo*, uma vez que a córnea é uma estrutura avascular, transparente e de fácil acesso e observação, de modo que qualquer vaso sanguíneo que cresça no seu estroma decorre do estímulo angiogênico utilizado (AUERBACH *et al.*, 2003). Tais peculiaridades anatômicas facilitam o monitoramento direto da resposta neovascular, de forma não invasiva, e permitem inclusive a aplicação tópica da droga em teste. Além disso, os neovasos, originados a partir do plexo vascular límbico, podem ser detectados na córnea mesmo na fase inicial da neovascularização (BECKER *et al.*, 1998).

Assim, uma característica importante dos ensaios de angiogênese em córnea é a possibilidade de múltiplas observações numa mesma unidade experimental, proporcionando o acompanhamento temporal e espacial do processo angiogênico por um longo período (CONRAD *et al.*, 1994).

Em modelos de neovascularização em córnea observa-se que a resposta angiogênica encontrada apresenta um padrão bifásico, na qual distinguiu-se uma fase de proliferação e outra de maturação (EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999). A primeira se caracteriza por intensa proliferação vascular. A densidade vascular é alta, observam-se inúmeros brotos, e a taxa de angiogênese alcança seu valor máximo. Já a segunda, caracteriza-se pela maturação vascular. Os neovasos se alongam, diminuem as ramificações, e a taxa de angiogênese se estabiliza.

1.3 Neovascularização corneana: aspectos fisiopatológicos

Em condições normais, o tecido corneano é transparente e isento de vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 1). Tais atributos são fundamentais para a integridade do eixo visual e estão associados a dois fenômenos. O primeiro é chamado de “privilegio imunológico”, isto é, a resistência natural ao desenvolvimento de inflamação que é inerente à córnea. O segundo, chamado de “privilegio angiogênico”, em analogia ao primeiro termo, designa a resistência natural da córnea ao desenvolvimento de vasos sanguíneos e linfáticos a partir do limbo. Os mecanismos que regulam a angiogênese na córnea e que, conseqüentemente, mantêm o “privilegio angiogênico” (avascularidade corneana) são pouco conhecidos. Acredita-se, porém, que vários fatores antiangiogênicos presentes na córnea e no humor aquoso estejam envolvidos. De fato, a regulação precisa da angiogênese corneana é também responsável pela manutenção do “privilegio imunológico” da córnea, além, obviamente, da sua transparência. Ambos os fenômenos não são, contudo, absolutos e podem ser anulados por diversas condições patológicas ou manipulações cirúrgicas da córnea (CURSIEFEN et al., 2004).

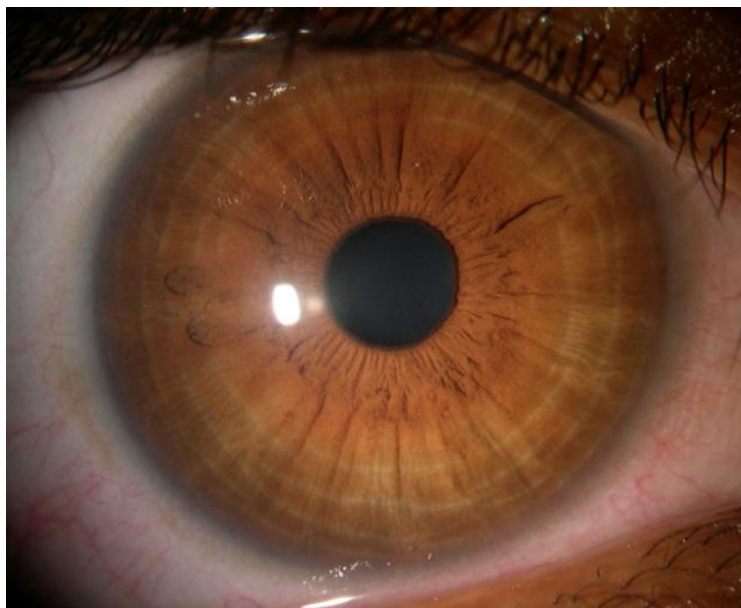


Figura 1. Córnea humana.

A neovascularização corneana, isto é, o crescimento de vasos sanguíneos no previamente avascular tecido corneano a partir do plexo vascular límbico (LEE; WANG; ADAMIS, 1998), é uma característica comum a diversas doenças da córnea, sejam elas de origem infecciosa, traumática, degenerativa ou inflamatória (JOUSSEN *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2003; POULAKI *et al.*, 2004). Entre as principais afecções associadas à importante neovascularização corneana citam-se: ceratite bacteriana, viral e fúngica, queimaduras químicas, rejeição de transplante de córnea, síndrome de Stevens-Johnson, pefingóide ocular, pterígio, degeneração marginal de Terrien, trauma, uso prolongado de lentes de contato (Figura 2) (LEE; WANG; ADAMIS, 1998; ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999; HOLZER *et al.*, 2003; SALOMOV *et al.*, 2005).

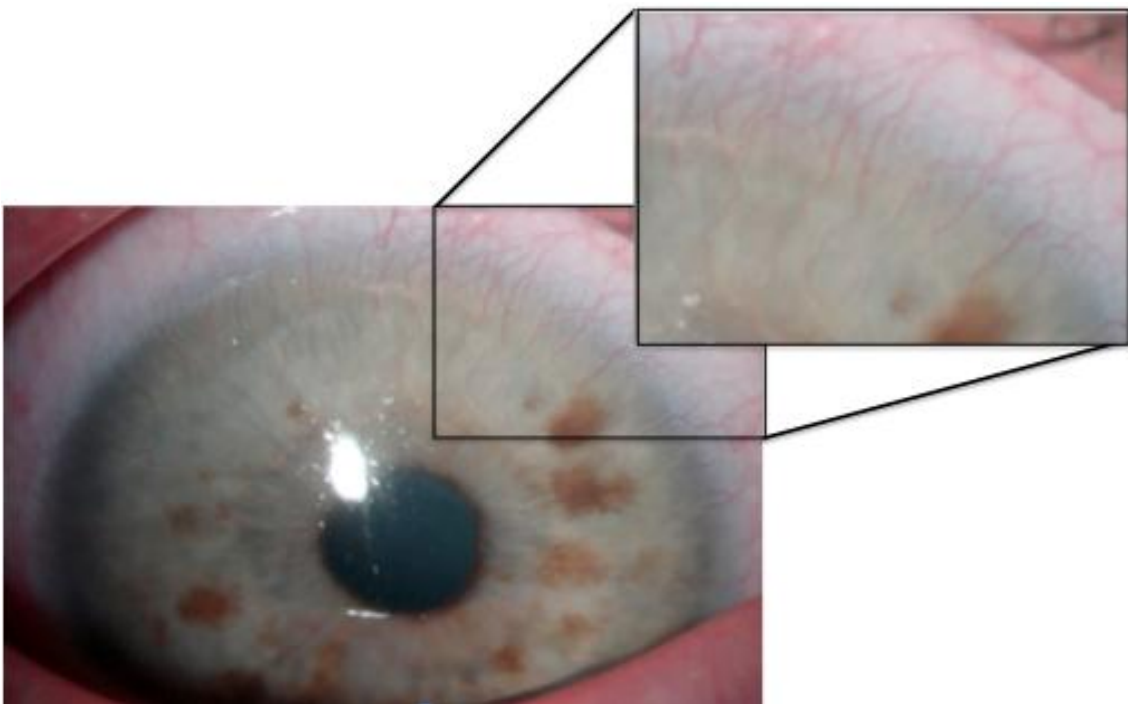


Figura 2. Neovascularização corneana secundário ao uso inadequado e prolongado de lentes de contato, com ênfase em alguns neovasos superficiais superiores.

Os principais estímulos para a neovascularização corneana são: inflamação, hipóxia e destruição das células germinativas límbicas (ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999). A hipóxia está associada mais comumente ao uso prolongado de lentes de contato (ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999; HOLZER

et al., 2003). A destruição ou depleção das células germinativas do limbo, por sua vez, resulta frequentemente em “conjuntivalização” da superfície da córnea. De fato, quando a lesão da córnea não envolve a margem límbica, a reparação do defeito epitelial é realizada pelo próprio epitélio corneano e pelo epitélio límbico adjacente, porém defeitos que resultam na destruição das células germinativas límbicas são reparados pelo epitélio conjuntival (LEE; WANG; ADAMIS, 1999).

Apesar de intensamente investigada, a patogênese da neovascularização corneana ainda não está totalmente compreendida (AMBATI *et al.*, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2003; SALOMOV *et al.*, 2005). Diversos mediadores e tipos celulares foram implicados. Num estudo para determinar os eventos celulares que precedem a angiogênese inflamatória em córnea murina, constatou-se que o infiltrado pré-angiogênico é composto essencialmente de granulócitos e monócitos (SUNDERKÖTTER *et al.*, 1991). Outro estudo demonstrou que a IL-1 e a IL-6 são produzidas numa fase precoce em córneas submetidas a queimaduras alcalinas e que estão associadas à infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) (SOTOZONO *et al.*, 1999).

Num modelo de angiogênese inflamatória em córnea de rato, verificou-se que o VEGF produzido por leucócitos que infiltram o estroma corneano – inicialmente neutrófilos e subsequentemente monócitos / macrófagos – desempenha papel fundamental na indução e manutenção da neovascularização em córneas cauterizadas, e que tanto a hipóxia e mediadores inflamatórios aumentam a expressão do VEGF na vizinhança da lesão (EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999). Este, por sua vez, induz a migração e proliferação da célula endotelial. Além disso, o VEGF foi o primeiro mediador endógeno da neovascularização corneana a ser identificado (ADAMIS; AIELLO; D’AMATO, 1999).

Vários outros autores também enfatizaram a importância do VEGF como o estímulo principal na angiogênese corneana inflamatória (MOROMIZATO *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; AMBATI *et al.*, 2003; POULAKI *et al.*, 2004; USUI *et al.*, 2005).

Cursiefen *et al.* (2004) propuseram, utilizando um modelo de angiogênese inflamatória em córnea de camundongo induzida por um fio de sutura, que o recrutamento de monócitos/macrófagos, derivados da medula

óssea e que expressam o receptor do VEGF 1 (VEGFR-1), pelo VEGF, desempenha um papel importante na indução da neovascularização inflamatória. Estes mesmos leucócitos atuam também na liberação de fatores angiogênicos que amplificam a angiogênese patológica.

Kon *et al.* (2003) postularam que o NO age como um mediador pró-angiogênico na neovascularização corneana inflamatória, promovendo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. Castro, Lutz e Edelman (2004) demonstraram que os inibidores seletivos e não seletivos da COX-2 bloqueavam parcialmente a angiogênese inflamatória em córnea de rato e concluíram que os produtos resultantes da ação da COX-2 estão entre os diversos mediadores que modulam a expressão do VEGF na neovascularização induzida pela inflamação.

Sonoda *et al.* (2005) postularam que células derivadas da medula óssea são recrutadas para a córnea sadia, avascular, onde realizam a depuração das escórias metabólicas, sendo, pois, essenciais para a manutenção da transparência corneana. Além disso, se a córnea sofre uma lesão, tais células respondem prontamente à agressão com a produção de várias citocinas, que então iniciam a resposta imune. Concluíram ainda que, na córnea inflamada, os neutrófilos são responsáveis pelo edema e opacificação que surgem precocemente, enquanto os macrófagos são essenciais para a indução de angiogênese corneana e para a cronicidade da inflamação (Figura 3).

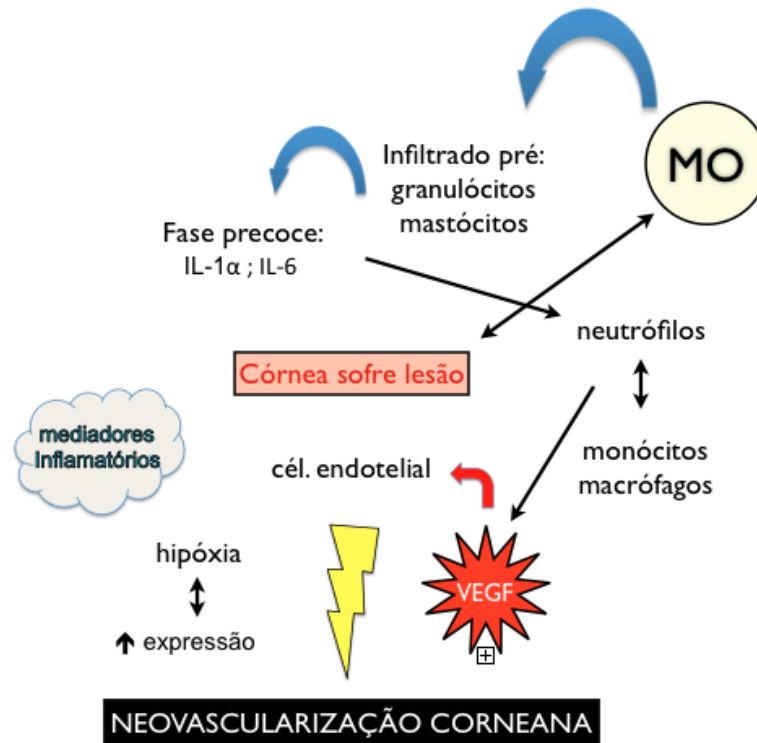


Figura 3. Representação esquemática e simplificada do processo de neovascularização da córnea.

O envolvimento de vários outros mediadores na neovascularização corneana inflamatória também foi investigado, entre os quais citam-se: FGF-2, angiogenina, prostaglandinas, IL-2, IL-8, PDGF (KWON *et al.*, 2005), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (MOROMIZATO *et al.*, 2000), ativina A e integrina $\alpha\beta 5$ (POULAKI *et al.*, 2004).

Pelo exposto, nota-se a necessidade de estudos mais profundos para desvendar os mecanismos celulares e, sobretudo, moleculares envolvidos na neovascularização corneana inflamatória. Nesse sentido, os modelos de angiogênese inflamatória em córnea, seja de coelho, rato ou camundongo, são de fundamental importância, visto que simulam com maior realismo as situações clínicas onde a neovascularização corneana é induzida por estímulo inflamatório (CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004). Assim, nesses casos, tais modelos são preferíveis aos ensaios que utilizam microbolsa corneana com implante de *pellets* contendo um estímulo angiogênico único, onde a resposta inflamatória é mínima (YOSHIDA *et al.*, 2003).

Recentemente, tem-se estudado como a nanotecnologia e a nanomedicina podem auxiliar no tratamento de doenças oftalmológicas. Em

relação à neovascularização corneana, Jani *et al.* (2007) relataram sobre nanopartículas capazes de suprimir neovascularização corneana experimental induzido por cauterização alcalina. Zhou *et al.* (2010) realizaram injeção subconjuntival de Ad-Vasohibin-1, um adenovírus recombinante capaz de codificar vasohibin-1 humano (um inibidor do processo angiogênico expresso no endotélio vascular), em ratos com neovascularização corneana induzido por queimadura química e demonstraram seu efeito antiangiogênico, provavelmente pela capacidade de diminuir a expressão de VEGFR2. Atualmente, a nanotecnologia já tem sido utilizado para diferentes doenças em oftalmologia, e muitas outras aplicações irão ocorrer no próximo século (ZARBIN *et al.*, 2010).

1.4 Talidomida

Talidomida, um derivado sintético do ácido glutâmico, é um fármaco que além de propriedade antiangiogênica apresenta outras características peculiares. Ela foi introduzida no mercado como sedativo em 1957 (KENYON; BROWNE; D'AMATO, 1997), porém foi caracterizada por promover malformação em membros de recém-nascidos, chamada de focomelia, cujas mães fizeram seu uso durante a gravidez. No entanto, com a descoberta de sua teratogenicidade, ela foi retirada do mercado (GONZÁLEZ, 2001). Anos mais tarde, em 1994, documentaram que nos recém-nascidos, os quais as mães faziam uso deste fármaco durante a gestação, ocorria uma inibição do crescimento vascular nos brotos dos membros em desenvolvimento, durante o período embrionário, o que ocasionava a anomalia. Entretanto, provou-se também que a talidomida possuía importantes propriedades, como imunomoduladora e anti-inflamatória, abrindo novas perspectivas para o uso clínico desse fármaco numa variedade de condições, entre as quais: doença de Behçet, eritema nodoso leproso, doença do enxerto versus hospedeiro, síndrome da imunodeficiência adquirida, doença de Crohn (MACPHERSON *et al.*, 2003). Seguidamente a constatação da atividade antiangiogênica da talidomida, propuseram então à idéia de empregá-la no tratamento de doenças dependentes de angiogênese, como no câncer (MACPHERSON *et al.*, 2003).

As propriedades biológicas da talidomida estão associadas, principalmente, à inibição da produção do TNF- α , uma citocina necessária para dar início à inflamação e, conseqüentemente, à neovascularização, produzida por monócitos e macrófagos. Além disso, também ocorre uma resistência ao processo angiogênico devido ao efeito inibitório da talidomida acerca do VEGF e FGF-2, como habitual em fármacos antiangiogênicos (MACPHERSON et al., 2003; ELEUTHERAKISPAPAIKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004).

Provavelmente a bioatividade da talidomida é, em parte, controlada pelo fator nuclear *kappa* β (NF- κ B). O TNF- α induz à ativação do NF- κ B que, quando ativado, regula a expressão de vários genes envolvidos na proliferação celular, inflamação, angiogênese e inibição da apoptose. Porém dois dos genes regulados pelo NF- κ B ativado expressam os fatores pró-angiogênicos VEGF e IL-8. Assim, postulou-se que o efeito antiangiogênico da talidomida era devido a uma seqüência de acontecimentos que finaliza com a inibição indireta da neovascularização. Esta seqüência de eventos começa com o efeito inibitório que a talidomida tem sobre o TNF- α , que, inibido, não induzirá a ativação do NF- κ B, suspendendo a expressão de vários genes, fundamentalmente os que codificam o fator pró-angiogênico VEGF, limitando a formação de novos vasos sanguíneos (MACPHERSON et al., 2003) (Figura 4).

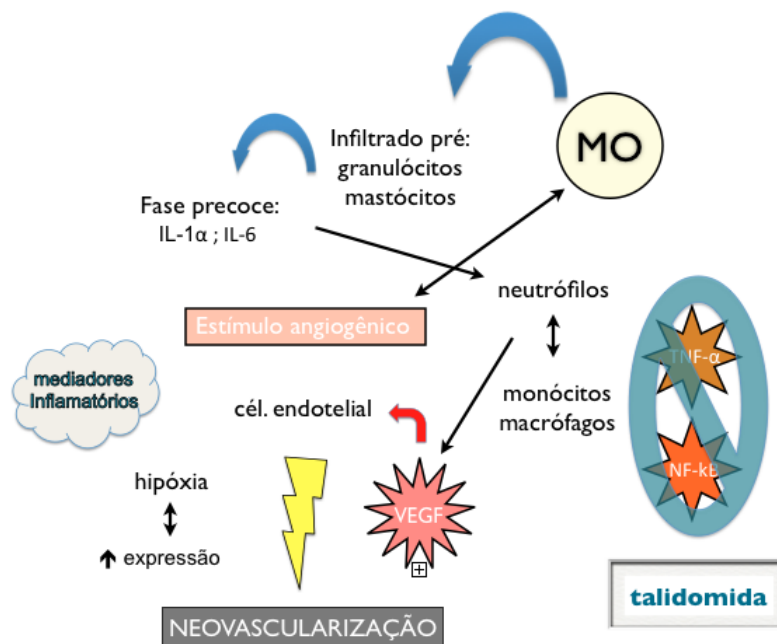


Figura 4. Representação esquemática e simplificada do mecanismo de ação da talidomida.

Assim, diante da utilidade da talidomida como um fármaco com características antiangiogênica, anti-inflamatória e imunomoduladora, novas pesquisas surgiram no intuito de descobrir drogas com propriedades análogas a sua, mas com capacidade de minimizar seus eventuais efeitos adversos, assim como anular sua clássica característica teratogênica.

1.5 LASSBio-596: um análogo da talidomida

LASSBio-596, que foi estruturalmente designado como um híbrido da talidomida, sildenafil (inibidor seletivo de fosfodiesterase-5) e arilsulfonamida (protótipo inibidor seletivo de fosfodiesterase-4), é um agente que exhibe importantes propriedades anti-inflamatória e imunomoduladora (LIMA *et al.*, 2002; ROCCO *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2006). Esse análogo da talidomida, obtido através de reações de hidrólise de sua estrutura, não possui o anel phtalimida (responsável pelo efeito teratogênico da talidomida), sugerindo a provável ausência de um eventual efeito teratogênico deste novo componente (Figura 5) (LIMA; DE LIMA, 2009).

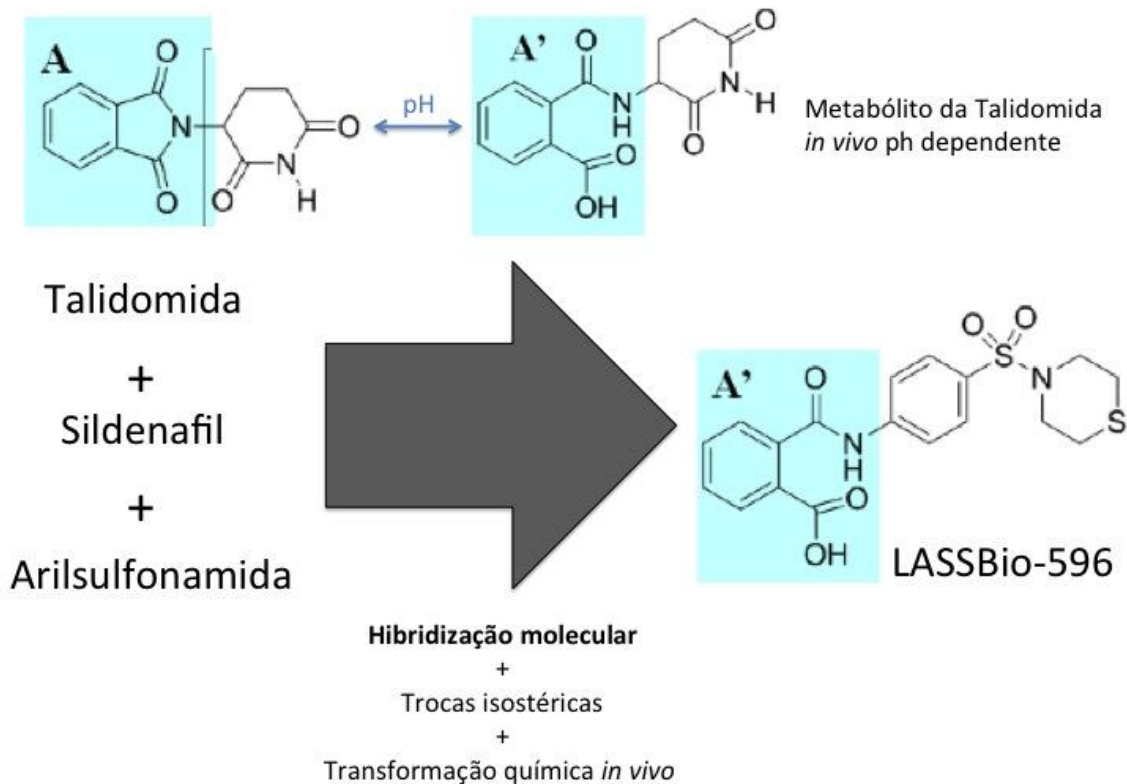


Figura 5. Estruturas químicas da talidomida, seu metabólito e do LASSBio-596, evidenciando o processo de hibridização molecular da talidomida, sildenafil e arilsulfonamida na formação do LASSBio-596. Radical **A** representa radical da talidomida que de acordo com o pH transforma-se em radical **A'** *in vivo*. Radical **A'** mantém-se na estrutura química do LASSBio-596.

LASSBio-596 modula o processo inflamatório demonstrando ter potente atividade inibitória do recrutamento de neutrófilos induzido por lipopolissacarídeo que está correlacionado com seu efeito inibidor dos níveis de TNF- α (LIMA *et al.*, 2002).

Já em um estudo envolvendo inflamação pulmonar, LASSBio-596 atenuou o aumento dos níveis de TNF- α no fluido do lavado broncoalveolar e inibiu a neutrofilia pulmonar, além de ter demonstrado efeito protetor contra a formação de edema pulmonar (ROCCO *et al.*, 2003).

Em 2010, foi realizado uma revisão a respeito da trajetória da descoberta do LASSBio-596 como um novo candidato a fármaco antiasmático, evidenciando-se os primeiros ensaios pré-clínicos em modelo murino de asma aguda e crônica, com propriedade broncodilatadora, anti-inflamatória e com ações benéficas no remodelamento das vias aéreas, até estudos farmacocinéticos e toxicológicos em roedores e determinação de

genotoxicidade e mutagenicidade que antecedem a eventual etapa de estudos clínicos de Fase I (ROCCO *et al.*, 2010). Constatou-se que o LASSBio-596 não apresentou efeito genotóxico e/ou mutagênico, em condições *in vitro*. Quando administrado por via oral, apresentou baixa biodisponibilidade e curto tempo de meia-vida. Nos ensaios de toxicidade aguda e crônica em roedores, não apresentou toxicidade aguda e crônica, embora, com uso crônico por 90 dias consecutivos, tenham sido observados algumas alterações histopatológicas e hematológicas (ROCCO *et al.*, 2010).

Recentemente, o LASSBio-596 foi estudado em modelo experimental de inflamação pulmonar e hepática induzido por microcistina-LR, uma toxina produzida por cianobactérias, tendo sido capaz de tratar o dano funcional pulmonar agudo por via intraperitoneal (i.p.) e, por via oral (*per os*), capaz de prevenir inflamação pulmonar e hepática, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2010; CASQUILHO *et al.*, 2011).

Todavia, o LASSBio-596, com essa sua importante ação anti-inflamatória, não havia sido estudado em modelos de angiogênese. Além disso, partindo-se do princípio desse composto ser formado quimicamente a partir da molécula da talidomida, com importante ação farmacológica modeladora de TNF- α , dentro outros mediadores inflamatórios, resolveu-se investigar seu efeito na angiogênese inflamatória.

1.6 Relevância e justificativa

Diversos estudos demonstraram o efeito inibitório da talidomida na angiogênese corneana induzida por fatores angiogênicos específicos, como FGF-2 (D'AMATO *et al.*, 1994; GONZÁLEZ *et al.*, 2001) e VEGF (KENYON; BROWNE, D'AMATO, 1997; KRUSE *et al.*, 1998; JOUSSEN *et al.*, 1999).

Além disso, a talidomida, administrada por via oral, é capaz de inibir a angiogênese corneana inflamatória (FECHINE-JAMACARU, 2006), ainda que parcialmente (47,2%).

Considerando que o LASSBio-596 é um análogo da talidomida, por também apresentar ação moduladora dos efeitos do TNF- α , resolveu-se investigar o efeito desse fármaco na angiogênese corneana inflamatória.

Mais ainda, optou-se pela administração por via tópica com o intuito de aumentar a eficácia do fármaco avaliado, diminuindo absorção sistêmica e possíveis efeitos colaterais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito do fármaco LASSBio-596, um composto análogo da talidomida, na angiogênese corneana inflamatória.

2.2 Específicos

Induzir angiogênese inflamatória em córnea de coelho mediante uma cauterização pontual com hidróxido de sódio (NaOH).

Elaborar um colírio do fármaco avaliado para realizar a administração por via tópica no intuito de aumentar sua eficácia e diminuir sua absorção sistêmica.

Investigar a atividade antiangiogênica do fármaco, considerando a concentração de 1,0%.

Monitorar temporalmente o processo angiogênico utilizando um sistema automático para a quantificação da angiogênese.

3 MÉTODO

3.1 Animais

O estudo foi realizado conforme o protocolo nº 59/08 aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), da Universidade Federal do Ceará (UFC), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos, brancos, da raça Nova Zelândia, saudáveis, com idade entre 90 e 120 dias e peso variando entre 1.800 e 2.700 gramas, procedentes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFC, os quais foram previamente examinados para exclusão de doenças oculares externas.

Os coelhos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UFC, alojados em gaiolas individuais de 50x50x50 cm e coletivas de 80x50x60 cm, estas com capacidade para abrigar até 3 animais adultos. Permaneceram em um ambiente climatizado, em condições adequadas de temperatura e umidade, com iluminação apropriada, observando-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Foram oferecidos água e alimento *ad libitum*. Este último consiste de ração balanceada própria para coelhos (Fri-Coelhos®, DISPA – Indústria de Rações, Maracanaú – CE).

Os animais foram submetidos a um período de adaptação de pelo menos sete dias, que precederam a realização dos procedimentos. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microcirurgia, parte integrante do Laboratório de Cirurgia Experimental.

3.2 Preparação dos colírios experimentais

LASSBio-596, um sal sódico, foi obtido a partir do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®) da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Neste estudo, LASSBio-596 foi administrado em uma solução aquosa, a fim de se desenvolver um colírio. O processo de solubilização da droga foi realizado no Departamento de Química da UFC.

Primeiramente, uma solução a 1,0% de LASSBio-596, feita com cloreto de benzalcônio (0,1%) associado a salina 0,9%, sofreu agitação magnética durante 5 minutos. Para esta solução, foi adicionado o copolímero PE114CL20 (1,0%) e Tween 80 (0,02%). A homogeneização foi realizada em um homogeneizador ultrassônico, Sonifier II-450 W (70 W, 0 ciclo, Ms73 ponta, 60 s), com amostra arrefecida num banho de gelo. A amostra foi finalmente filtrada através de um filtro de membrana de 0,45 μ m (Millex-HA Filtro Unidades, Millipore™). Para controlar qualquer confundimento do efeito do veículo do colírio do composto LASSBio-596 sobre a superfície ocular, o colírio Veículo (uma solução de cloreto de benzalcônio 0,1% associado a salina 0,9% adicionado ao copolímero PE114CL20 1,0% e Tween 80 0,02%) foi adicionado como controle para o estudo. Dexametasona (Med. Farm. – Comércio e Representações LTDA.) a 40 mg/ml (4%) foi preparado em água estéril destilada adicionada a uma solução do conservante cloreto de benzalcônio 0,1% associando a salina 0,9% (Figuras 6 e 7). Ao final, todos foram acondicionados em frascos conta-gotas (30 ml cada, sendo cada gota aproximadamente 40 μ l).

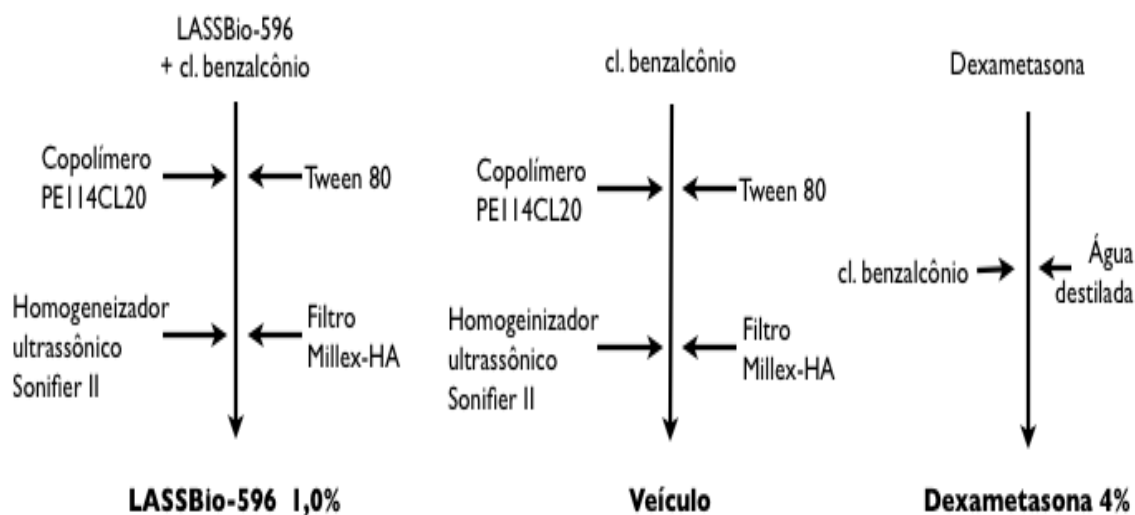


Figura 6. Preparação dos colírios experimentais.



Figura 7. Colírios experimentais.

3.3 Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho

Foram utilizados 18 coelhos machos, brancos, da raça Nova Zelândia, previamente examinados para a exclusão de doenças externas oculares. Para a realização da cauterização, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (12 mg/kg) associado a cloridrato de xilazina (4 mg/kg), complementada com instilação de 2 gotas do anestésico tópico cloridrato de proximetacaína 0,5% no saco conjuntival, e posicionados em decúbito lateral esquerdo numa base de isopor apropriada. Posteriormente, utilizou-se um blefarostato, desenvolvido especificamente para este propósito, expondo quase que totalmente a superfície corneana e a área do limbo superior. Em seguida, os coelhos foram submetidos a uma cauterização pontual na periferia superior da córnea direita, com o auxílio de um microscópio com um aumento de 16 vezes. Para tanto, foi utilizado uma peça circular de papel filtro com 3 mm de diâmetro, previamente embebida numa solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 molar (M) durante 30 segundos, sendo o excesso da solução retirado com ajuda de gaze. O papel filtro foi posicionado a aproximadamente 1 mm do limbo corneoescleral, num ponto situado às 12 horas, próximo à inserção do músculo ocular reto superior. A peça de papel filtro permaneceu na superfície corneana durante 2 minutos (Figura 8). Logo após a sua remoção, o olho foi irrigado com 5 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%. A técnica produziu um local de cauterização

homogêneo, circular, com bordas bem definidas e de 3,5mm de diâmetro (Figura 9). Os animais retornaram em seguida para as suas respectivas gaiolas apenas após completa recuperação do efeito anestésico.

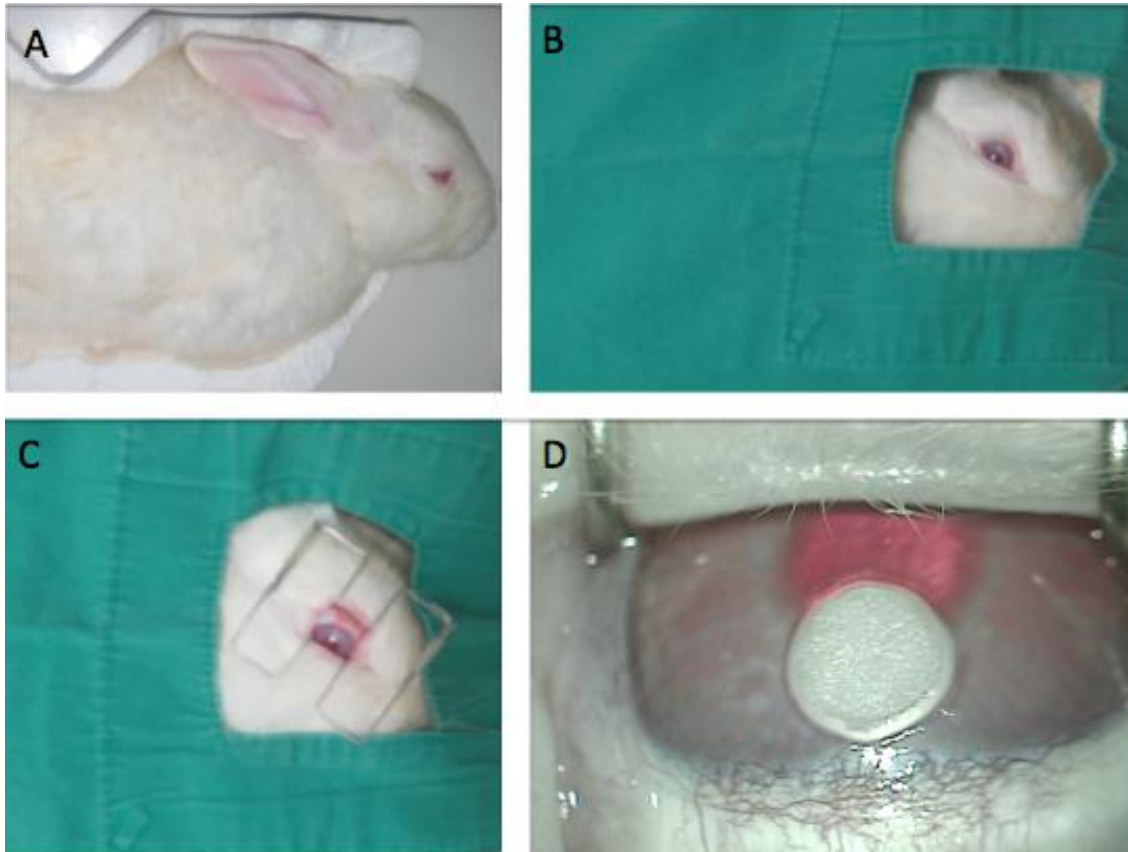


Figura 8. Posicionamento do coelho em decúbito lateral esquerdo (A). Aposição de campos (B) e colocação do blefarostato graduável, expondo a córnea e a região límbica superior (C). Posicionamento da peça circular de papel de filtro a 1 mm do limbo corneoescleral (D).

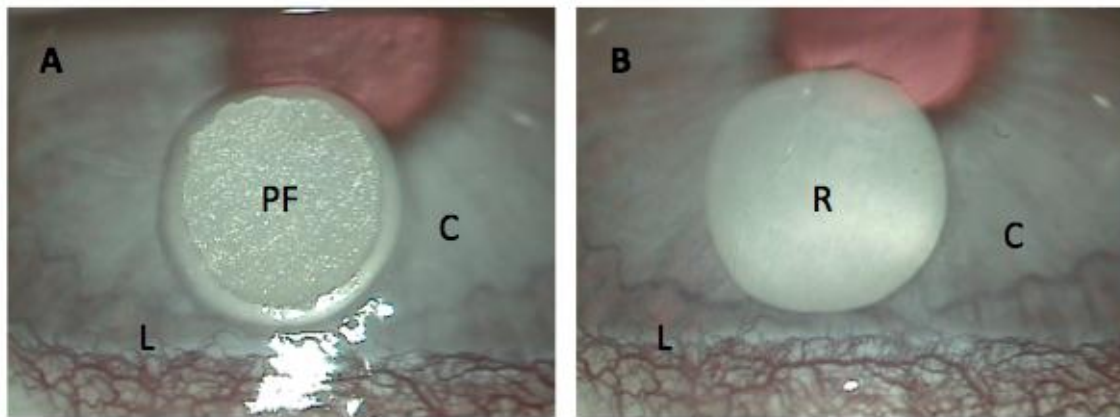


Figura 9. Peça de papel de filtro posicionada na periferia superior da córnea direita (A); aspecto da lesão resultante (B). C: córnea; L: região límbica; PF: peça de papel filtro; R: região cauterizada. Magnificação de 25 vezes.

3.4 Desenho experimental

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX). Os coelhos foram, então, randomizados por sorteio e distribuídos em três grupos de tratamento:

- Grupo Veículo (controle negativo): constituído por 6 coelhos, que foram tratados com 1 gota (40 µl) do colírio formado pela solução do veículo, instilada no saco conjuntival de 8 em 8 horas;
- Grupo Dexametasona (controle positivo): formado por 6 coelhos, que foram tratados com instilação tópica de 1 gota (40 µl) de colírio de dexametasona a 4,0% de 8 em 8 horas;
- Grupo LASSBio-596 1,0% (grupo teste): constituído por 6 coelhos, que foram tratados com o fármaco LASSBio-596, diluído numa solução na concentração de 1,0%, compreendendo a aplicação tópica de 1 gota (40 µl) de 8 em 8 horas.

Os tratamentos foram iniciados no dia da cauterização (dia zero) e se estenderam por 21 dias (Figura 10). Os animais foram avaliados, subseqüentemente, nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização (Figura 11) .

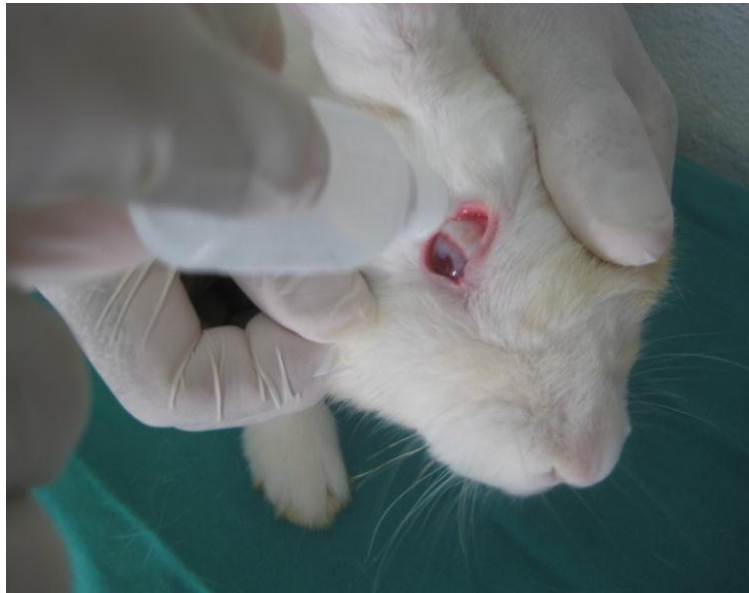


Figura 10. Instilação do colírio em saco conjuntival de córnea já cauterizada.

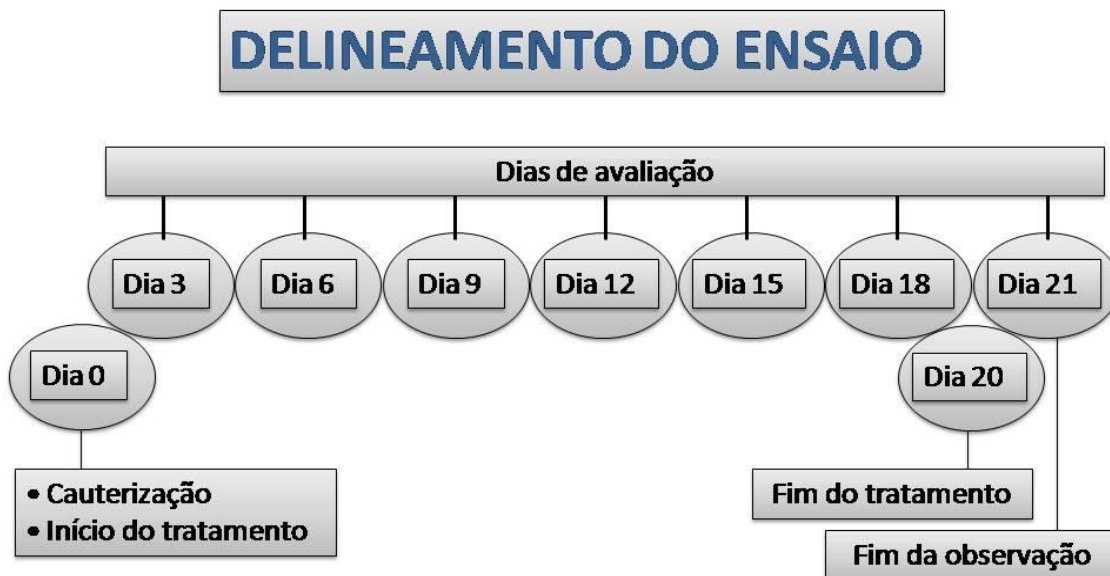


Figura 11. Delineamento do estudo, dando ênfase ao início e fim do tratamento, fim da observação e aos sete dias de avaliação. Importante lembrar que o experimento teve uma duração de vinte e um dias. Cada um dos 18 animais recebeu 1 gota de seu respectivo colírio de 8 em 8 horas durante vinte e um dias.

3.5 Procedimento de captura das imagens

O instrumental utilizado para a aquisição das imagens compreendeu:

- Um microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcellos M90, D.F. Vasconcellos S.A., São Paulo – SP) equipado com um divisor de luz e um adaptador para câmera de vídeo, além de um filtro verde;
- Uma câmera de vídeo (Hitachi VCC-151, Japan), instalada no microscópio, analógica, dotada de dispositivo de carga acoplada (CCD – *chargecoupled device*), geradora de imagens em cores, com saída de vídeo composto (*composite video*) e vídeo separado (S-vídeo: *separate video*);
- Um monitor vídeo de 20 polegadas (Cineral Eletrônica da Amazônia Ltda., Manaus – AM);
- Um microcomputador equipado com um sistema de captura de vídeo.

Imagens digitais da córnea contendo a região de angiogênese foram obtidas, de forma padronizada, por uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio cirúrgico, cujo sinal foi enviado a uma placa de captura instalada num microcomputador. O eixo do microscópio foi posicionado perpendicularmente ao plano tangente à periferia da córnea, para minimizar a distorção espacial decorrente da projeção de uma estrutura tridimensional e curva, como a córnea, numa imagem bidimensional. Além disso, foi acionado o filtro verde do microscópio para aumentar o contraste dos vasos sanguíneos. As imagens da córnea foram capturadas com uma magnificação de 25 vezes e armazenadas no formato Windows[®] bitmap (.bmp), com dimensões de 320 x 240 *pixels* (Figura 12).

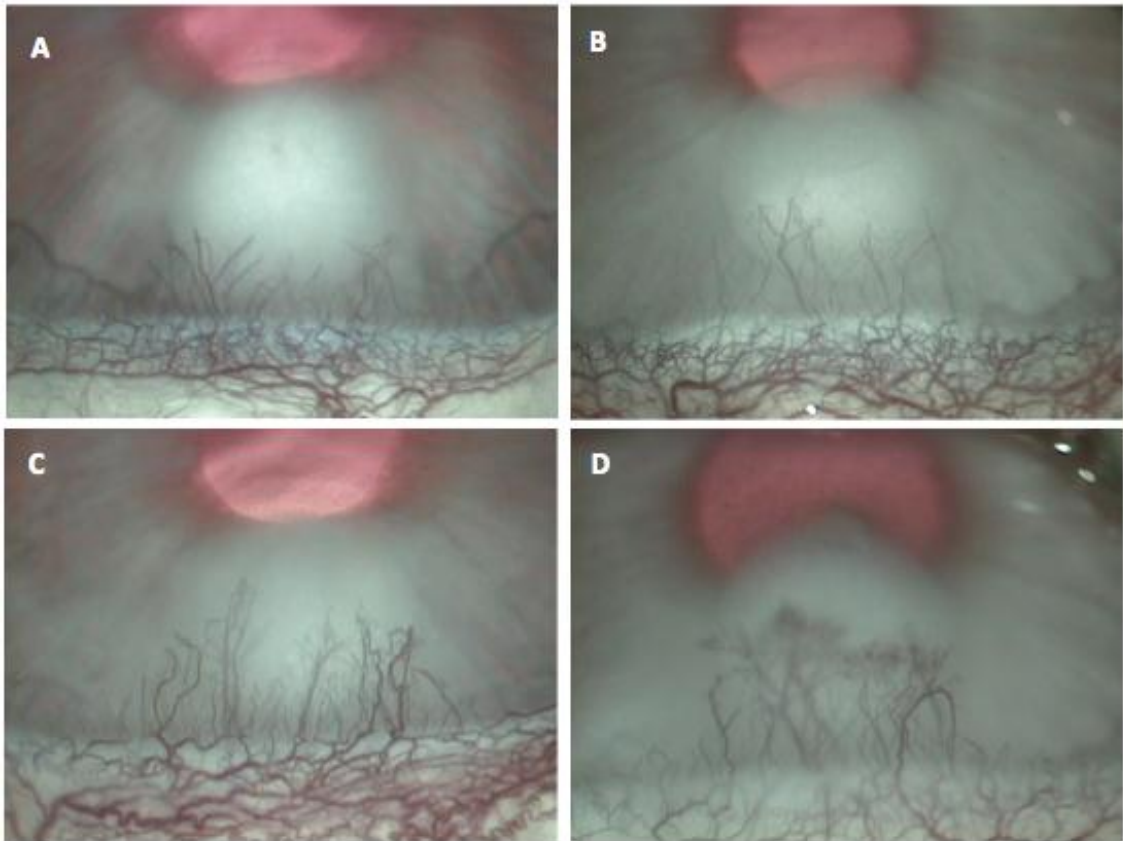


Figura 12. Imagens capturadas em diferentes fases do processo angiogênico.

3.6 Método de quantificação de angiogênese

A resposta angiogênica foi mensurada pelo Sistema de Quantificação de Angiogênese (SQAN), um *software* desenvolvido especificamente para tal finalidade (FECHINE-JAMACARU, 2006). O sistema processou as imagens digitais da córnea contendo a zona de angiogênese e determinou os seguintes parâmetros: área de neovascularização (AN), comprimento vascular total (CT) e número de vasos sanguíneos (NV) (Figuras 13, 14, 15 e 16).



Figura 13. Sistema de Quantificação de Angiogênese – SQAN.

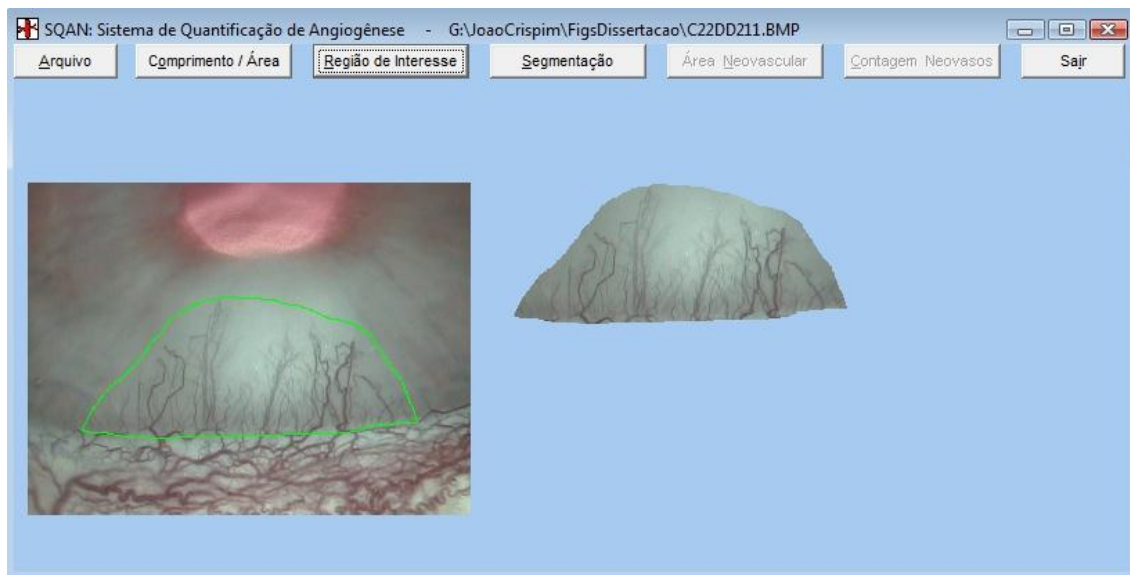


Figura 14. Demarcação de região de interesse.

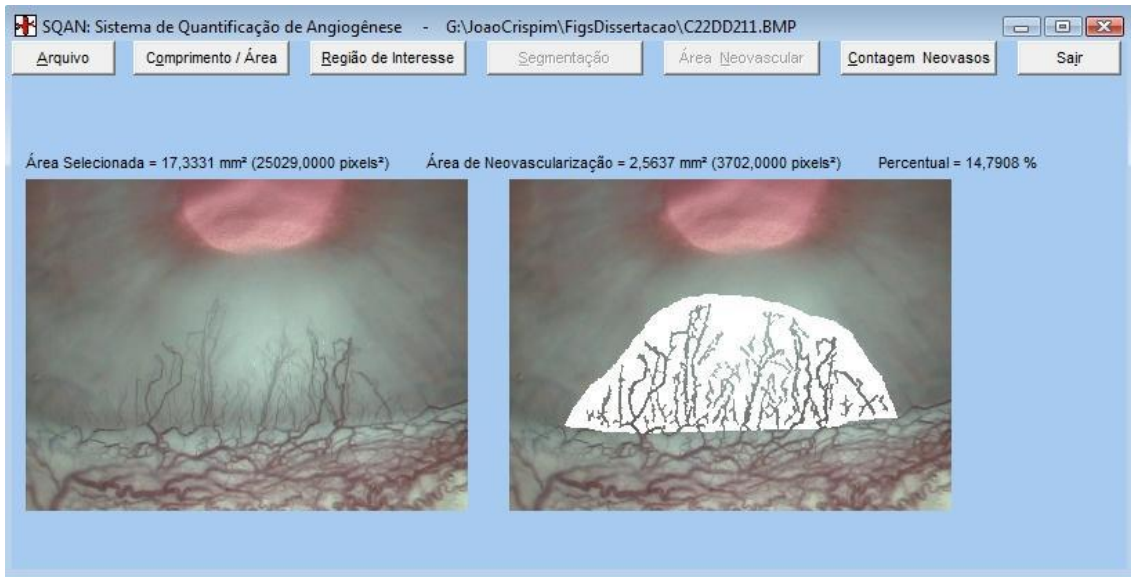


Figura 15. Cálculo da área de neovascularização.



Figura 16. Cálculo do comprimento vascular total.

A partir da área de neovascularização (A_N), foi calculado a taxa média de angiogênese (T_A) relativa a um dado intervalo de tempo (t), assim como a eficácia terapêutica dos fármacos estudados (E_F), de acordo com as seguintes equações:

$$T_A = \frac{A_N(t_2) - A_N(t_1)}{t_2 - t_1} \cdot 100$$

$$E_F = \frac{A_N(C) - A_N(F)}{A_N(C)} \cdot 100$$

A avaliação de tais parâmetros propiciou, então, o monitoramento espacial e temporal da resposta angiogênica *in vivo* e, por conseguinte, uma análise quantitativa do efeito inibitório das substâncias em teste.

3.7 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Assim, constatando-se tal requisito, foi calculado, para a estatística descritiva, a média e o desvio padrão, bem como foram empregados testes paramétricos para a análise dos dados. Para comparar os três grupos de tratamento, foi utilizado a análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. O teste *t* para variáveis independentes foi usado para comparar duas variáveis não emparelhadas. Comparações entre duas variáveis emparelhadas foram feitas mediante o uso do teste *t* para variáveis emparelhadas.

Em todos os casos, foi estabelecido em 0,05 (5%) a probabilidade α do erro tipo I (nível de significância), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor *P* bicaudal menor que 0,05.

Para a análise dos dados, assim como para a elaboração dos gráficos, foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism[®] versão 5.00 para Windows[®] (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007).

4 RESULTADOS

Ao observar as imagens obtidas através do microscópio cirúrgico com um aumento de 25 vezes, notou-se bastante evidente a formação de neovasos na córnea tratada no grupo Veículo durante todos os dias do experimento (Figura 17). Já no grupo tratado com dexametasona, observou-se a presença de neovascularização corneana de forma incipiente e em pequeno número (Figura 18). Enquanto no grupo tratado com LASSBio-596, constatou-se uma situação intermediária, entre os grupos Veículo e Dexametasona, em relação ao número de neovasos na superfície da córnea (Figura 19).

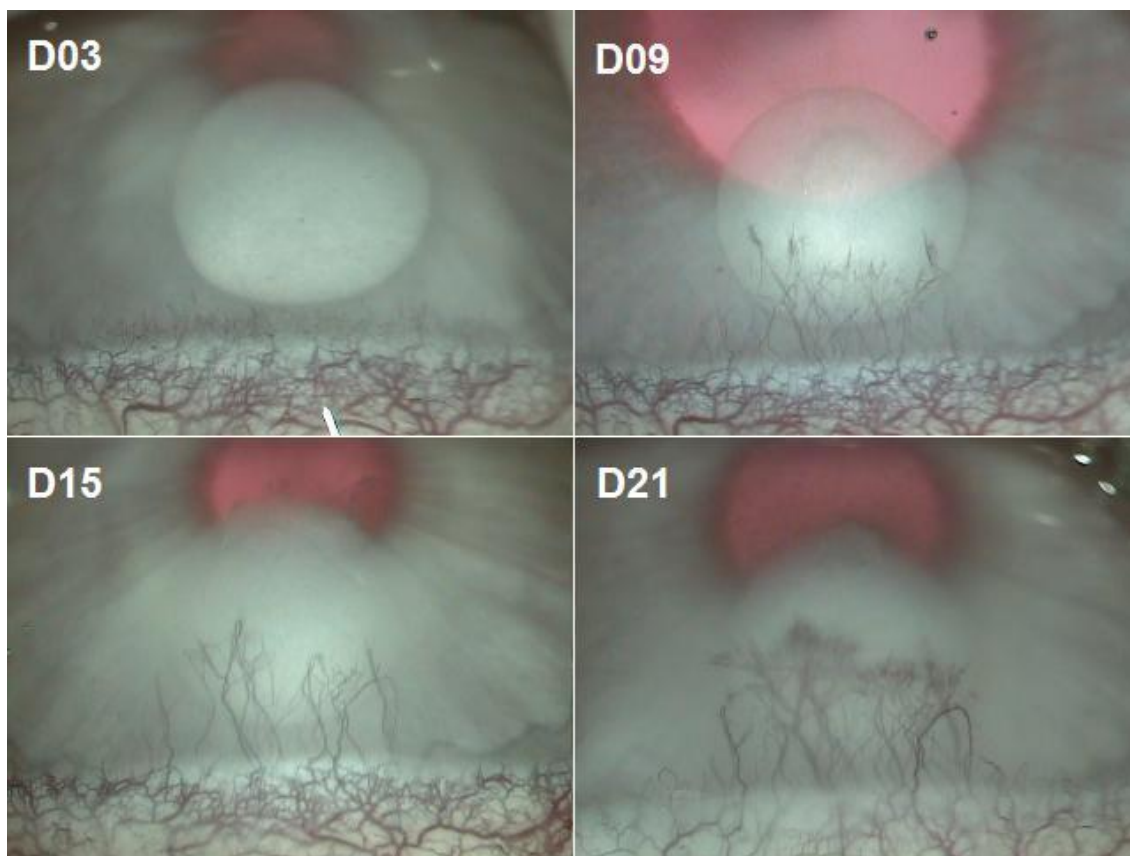


Figura 17. Aspecto da resposta angiogênica verificada no grupo Veículo nos dias 3, 9, 15 e 21 após a cauterização. Magnificação de 25 vezes.

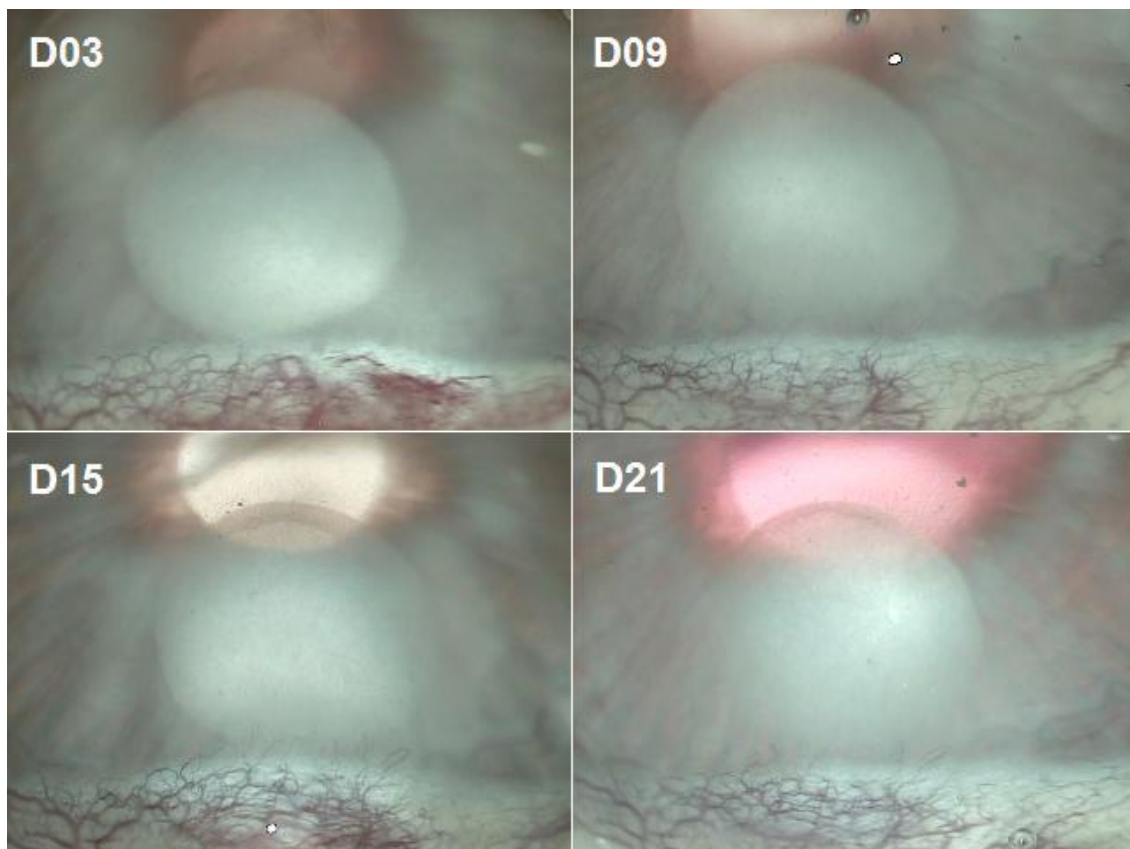


Figura 18. Aspecto da resposta angiogênica verificada no grupo Dexametasona nos dias 3, 9, 15 e 21 após a cauterização. Magnificação de 25 vezes.

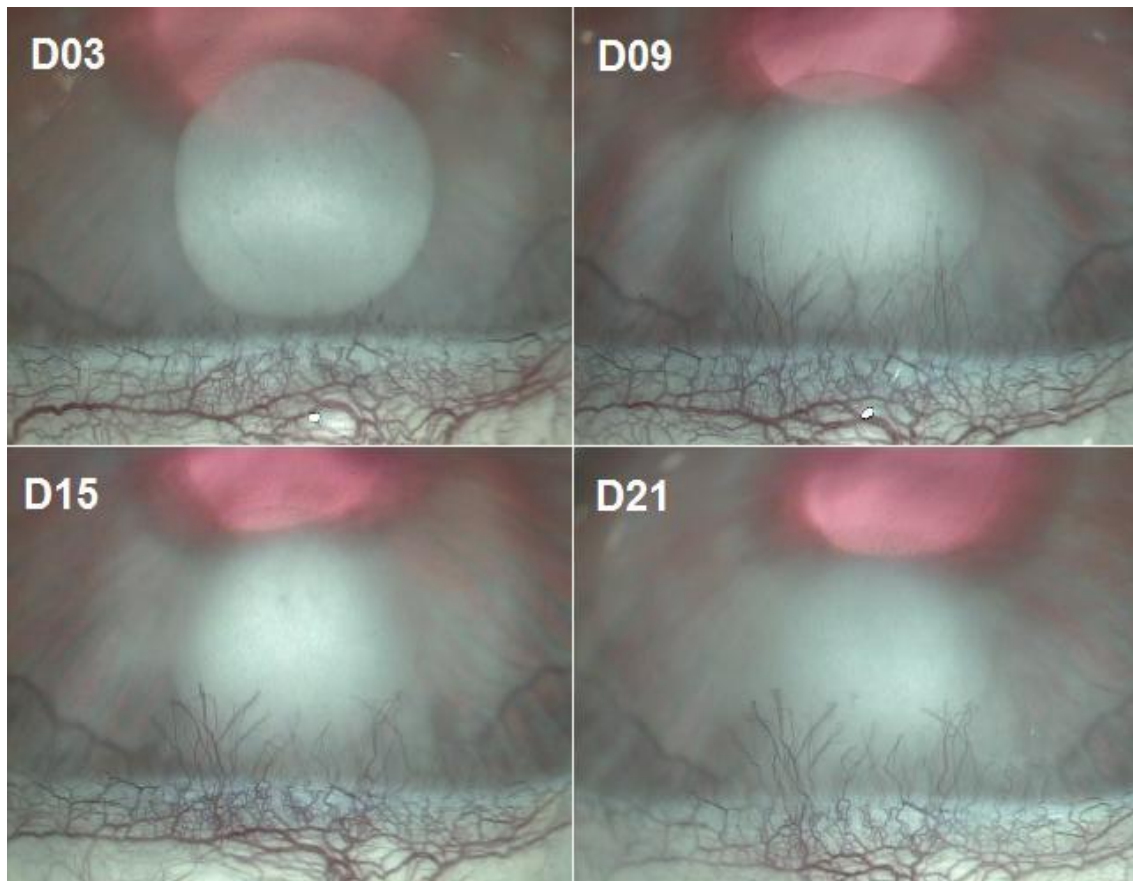


Figura 19. Aspecto da resposta angiogênica verificada no grupo LASSBio-596 nos dias 3, 9, 15 e 21 após a cauterização. Magnificação de 25 vezes.

Neste modelo de angiogênese inflamatória de córnea de coelho, a resposta angiogênica no grupo Veículo demonstrou um padrão bifásico: proliferação (entre 0 e 12 dias) e maturação (entre os dias 13 e 21). Avaliando os parâmetros AN, CT e NV, neste mesmo grupo, os valores máximos registrados foram, respectivamente, $1,998 \pm 0,622 \text{ mm}^2$ (dia 21), $31,956 \pm 10,535 \text{ mm}$ (dia 21) e $205,333 \pm 54,504$ vasos (dia 18) (Figuras 20, 21 e 22).

Ao se analisar os parâmetros angiogênicos AN, CT e NV no grupo Dexametasona, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) em comparação ao veículo no dia 3. Durante todas as avaliações subsequentes, houve uma redução ainda maior ($p < 0,001$) da dexametasona em relação ao veículo e ao LASSBio-596. Os valores máximos registrados dos parâmetros AN, CT e NV foram, respectivamente, $0,229 \pm 0,089 \text{ mm}^2$ (dia 18), $3,618 \pm 1,367 \text{ mm}$ (dia 18) e $26,000 \pm 20,396$ vasos (dia 9) (Figuras 20, 21 e 22).

Ao avaliar o efeito antiangiogênico da droga em estudo, o LASSBio-596 obteve a mesma tendência observada nos três parâmetros do

grupo Veículo nos primeiros seis dias. No entanto, a partir do sexto dia, o LASSBio-596 demonstrou uma redução na progressão angiogênica comparado ao veículo, mantendo-se assim até o final do experimento. Porém, essa redução observada não foi estatisticamente significativa. Relata-se ainda que todos os parâmetros foram mantidos praticamente constante no grupo LASSBio-596 a partir do sexto dia. Os valores máximos dos parâmetros angiogênicos AN, CT e NV foram, respectivamente, $1,680 \pm 0,322 \text{ mm}^2$ (dia 18), $27,202 \pm 6,216 \text{ mm}$ (dia 15) e $178,667 \pm 44,889$ vasos (dia 15) (Figuras 20, 21 e 21).

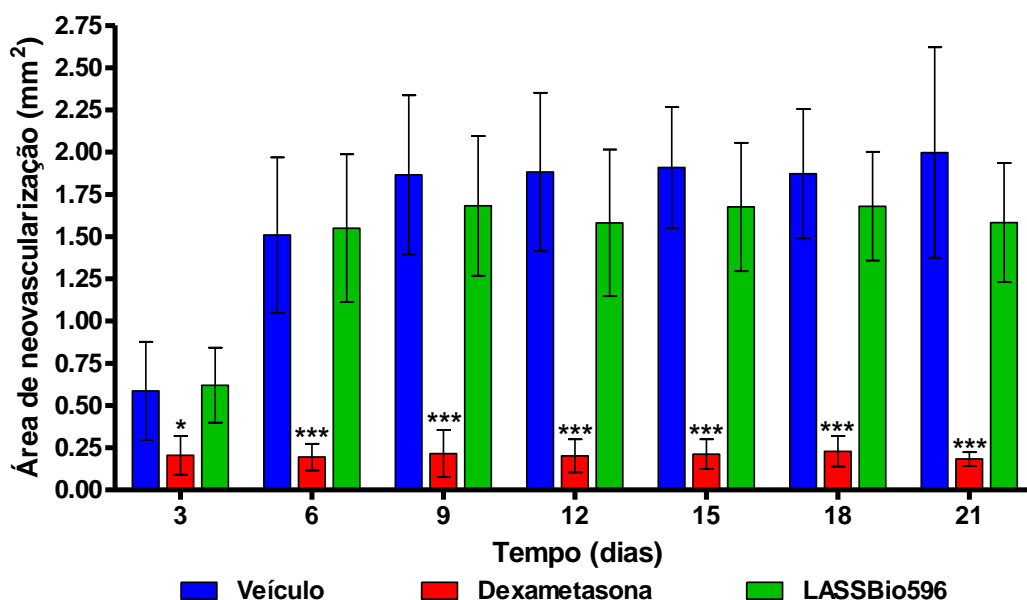


Figura 20. Quantificação da resposta angiogênica nos grupos Veículo, Dexametasona e LASSBio-596 conforme a variável área de neovascularização (AN). Os dados, expressos em mm^2 , correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais de cada grupo nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização. Para comparar os três grupos de tratamento num mesmo dia, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, que verificou diferenças entre os grupos dois a dois.

*P < 0,05, em relação ao Veículo e LASSBio-596.

***P < 0,001, em relação ao Veículo e LASSBio-596.

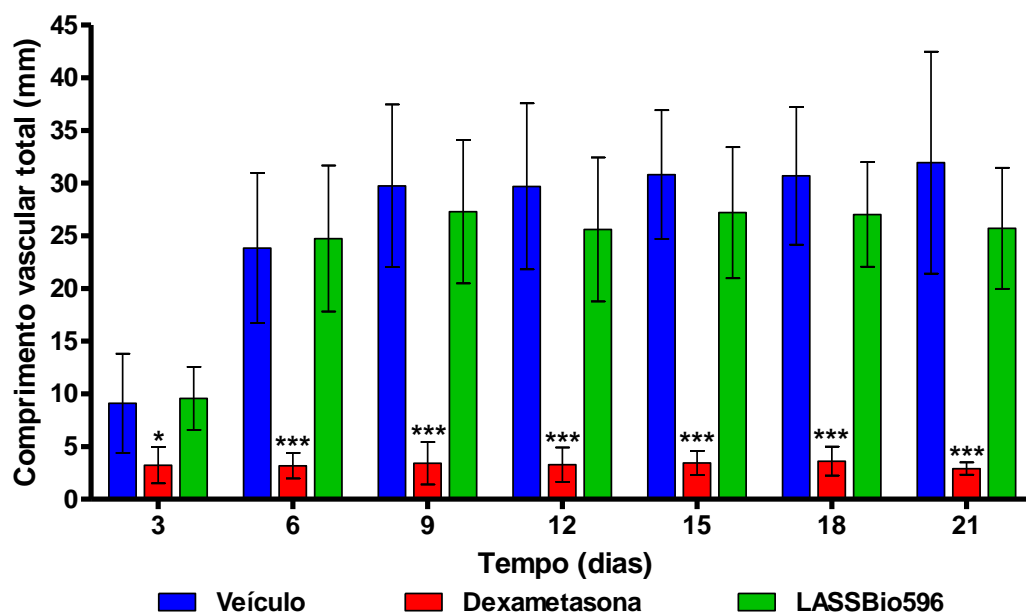


Figura 21. Quantificação da resposta angiogênica nos grupos Veículo, Dexametasona e LASSBio-596 conforme o parâmetro comprimento vascular total (CT). Os dados, expressos em mm, correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais de cada grupo nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização. Para comparar os três grupos de tratamento num mesmo dia, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, que verificou diferenças entre os grupos dois a dois.

*P < 0,05, em relação ao Veículo e LASSBio-596.

***P < 0,001, em relação ao Veículo e LASSBio-596.

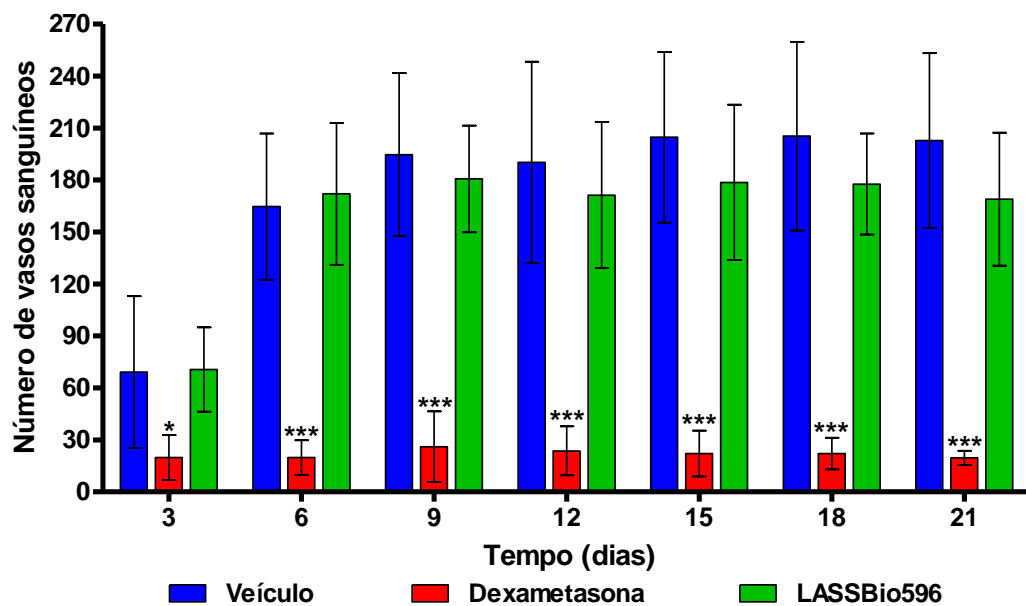


Figura 22. Quantificação da resposta angiogênica nos grupos Veículo, Dexametasona e LASSBio-596 conforme o parâmetro número de vasos sanguíneos (NV). Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais de cada grupo nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização. Para comparar os três grupos de tratamento num mesmo dia, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, que verificou diferenças entre os grupos dois a dois.

*P < 0,05, em relação ao Veículo e LASSBio-596.

***P < 0,001, em relação ao Veículo e LASSBio-596.

O crescimento vascular foi mensurado neste estudo através da Taxa média de Angiogênese (TA) entre os dias 3 e 21. No grupo Dexametasona, observou-se uma inibição completa da angiogênese corneana inflamatória com uma TA de $-0,001 \pm 0,006 \text{ mm}^2/\text{dia}$, demonstrando uma redução significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo Veículo e LASSBio-596 ($0,078 \pm 0,024 \text{ mm}^2/\text{dia}$) (Figura 23).

Ao analisar quantitativamente o crescimento vascular no grupo LASSBio-596, a TA mensurada ($0,054 \pm 0,012 \text{ mm}^2/\text{dia}$) foi menor que a observada no grupo Veículo ($0,078 \pm 0,024 \text{ mm}^2/\text{dia}$), tendo este dado apresentado significância estatística ($p < 0,05$) (Figura 23).

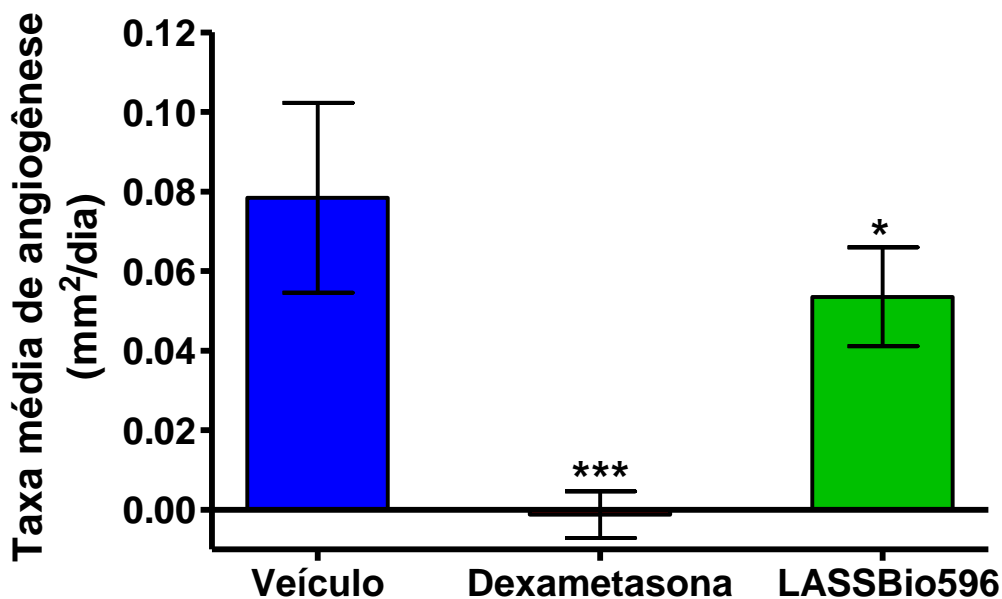


Figura 23. Taxa média de angiogênese (TA), em mm²/dia, referente ao período entre os dias 3 e 21, calculada nos grupos Veículo, Dexametasona e LASSBio-596. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais de cada grupo. A análise de variância (ANOVA) foi usada para comparar os três grupos de tratamento, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, que verificou diferenças entre os grupos dois a dois. *P < 0,05, em relação ao Veículo. ***P < 0,001, em relação ao Veículo e LASSBio-596.

Durante análise da resposta angiogênica através da TA referente ao período entre os dias 3 e 12 e ao intervalo entre os dias 12 e 21, pôde-se no estabelecer que, no grupo Veículo, a resposta angiogênica encontrada durante todos os dias de análise seguiu um padrão bifásico, na qual distinguiu-se uma fase de proliferação (3-12) e outra de maturação (12-21) (Figura 24). Constatou-se ainda que, no intervalo de 3-12 dias, a TA do grupo Dexametasona foi significativamente menor (***P < 0,001; teste de Tukey) que a dos grupos Veículo e LASSBio596. Ademais, nos grupos Veículo (++P = 0,0019; teste *t*) e LASSBio596 (+P = 0,0142; teste *t*), a TA mensurada no intervalo de 12-21 dias foi significativamente menor que a verificada no período de 3-12 dias (Figura 24).

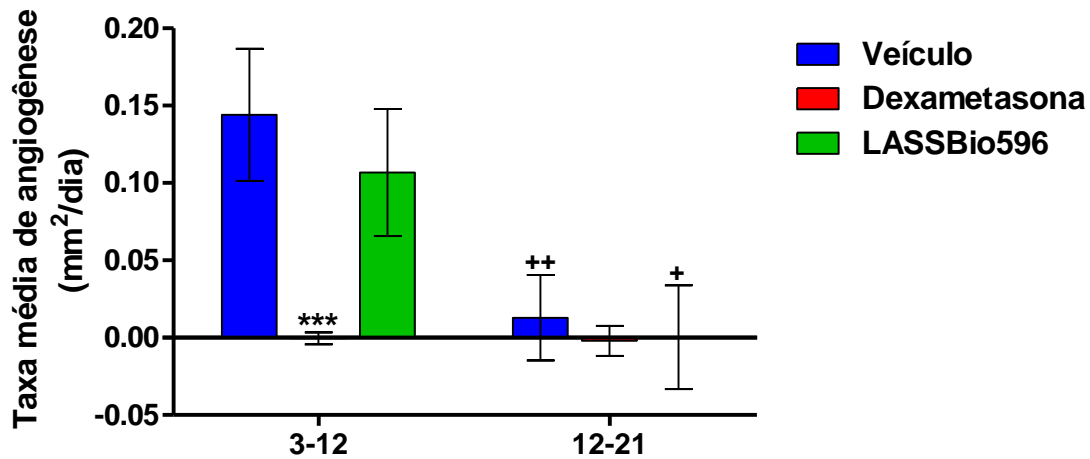


Figura 24. Taxa média de angiogênese (TA), em mm^2/dia , referente ao período entre os dias 3 e 12 e ao intervalo entre o 12^o e 21^o dia, calculada nos grupos Veículo, Dexametasona e LASSBio-596. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais de cada grupo. A análise de variância (ANOVA) foi usada para comparar os três grupos de tratamento num mesmo intervalo, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, que verificou diferenças entre os grupos dois a dois. Comparações entre os dois intervalos de tempo num mesmo grupo foram feitas pelo teste *t* para variáveis emparelhadas.

***P < 0,001 em relação ao Veículo e LASSBio-596

++P = 0,0019 em relação ao Veículo no intervalo 3-12

+P = 0,0142 em relação ao LASSBio-596 no intervalo 3-12

Avaliando-se a eficácia final dos tratamentos, observou-se que a dexametasona teve um efeito inibitório (EI) de 90,81%, calculado sobre a base de dados do grupo Veículo no dia 21, confirmando o seu elevado efeito antiangiogênico (Figura 25). Quanto ao LASSBio-596, houve um EI de 20,74% em comparação com o grupo Veículo.

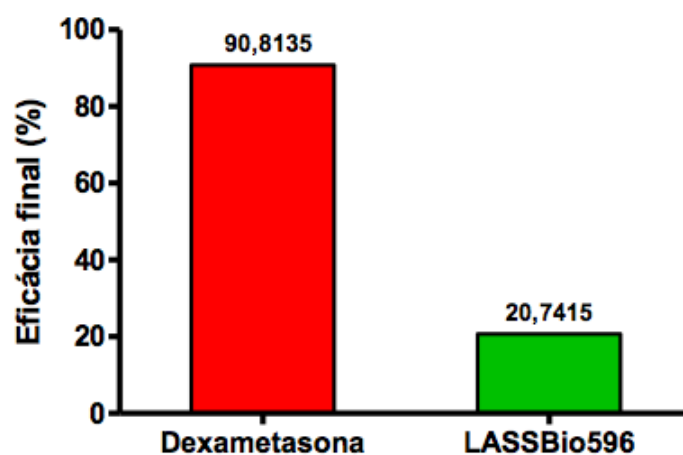


Figura 25. Eficácia final dos tratamentos com Dexametasona e LASSBio-596, expressa em termos percentuais, calculada em função dos dados do grupo Veículo no 21^o dia do experimento.

Vale salientar que não foram observados efeitos adversos nos grupos de animais avaliados que possam ter interferido com os resultados encontrados.

5 DISCUSSÃO

As descobertas das várias ações da talidomida influenciaram bastante a realização de novas pesquisas com referência ao seu efeito antiangiogênico (D'AMATO *et al.*, 1994; KENYON; BROWNE; D'AMATO, 1997; KRUSE *et al.*, 1998; JOUSSEN; GERMANN; KIRCHHOF, 1999). Com isso, tem-se procurado a descoberta de análogos antiangiogênicos que combinam alta potência anti-inflamatória com ausência de efeitos adversos mais graves. Para esse efeito, foi desenvolvido o LASSBio-596, um híbrido da talidomida, sildenafil e arilsulfonamida, obtido por reações de hidrólise da suas estruturas. A provável ausência de qualquer efeito teratogênico deste novo composto é atribuída à falta do anel phtalimida (responsável pelo efeito teratogênico da talidomida) (LIMA *et al.*, 2002; ROCCO *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2006).

Anteriormente, em um modelo de inflamação pulmonar, ROCCO *et al.* (2003) demonstraram potente atividade inibitória que o LASSBio-596 possui no recrutamento de leucócitos induzida por lipopolissacarídeo (LPS), correlacionando com o seu efeito atenuador dos níveis de TNF- α . CARVALHO *et al.* (2010) relataram em seu trabalho a ação anti-inflamatória do LASSBio-596 por via i.p. em estudos envolvendo modelos de inflamação pulmonar induzido por microcistina-LR, uma toxina liberada por cianobactérias, tendo sido capaz de reduzir o dano funcional pulmonar, além de diminuir estresse oxidativo, edema, espessamento de parede alveolar e influxo pulmonar de células inflamatórias polimorfonucleares (PNM). Já CASQUILHO *et al.* (2011) foram mais adiante e, administrando LASSBio-596 por via oral (*per os*) em modelo experimental de inflamação pulmonar e hepática induzido por microcistina-LR, demonstraram manutenção de todos parâmetros mecânicos pulmonares, células PNM, mediadores pró-inflamatórios, dentre eles TNF- α , IL-1 β e IL-6, similares com o do grupo controle. Devido a essa sua importante ação anti-inflamatória, o LASSBio-596 despertou nosso interesse em estudá-lo na angiogênese inflamatória, acreditando no seu potencial efeito antiangiogênico.

Durante este estudo, o LASSBio-596 foi administrado topicamente na forma de colírio na concentração de 1,0%, 3 vezes ao dia, e apresentou um potencial efeito inibitório sobre a angiogênese em comparação ao veículo, a

partir do sexto dia até o final do experimento. No grupo LASSBio-596, os valores dos quantificadores AN, CT, e NV revelaram a mesma evolução do grupo veículo nos primeiros seis dias. No entanto, a partir do sexto dia, o LASSBio-596 demonstrou uma redução na progressão da angiogênese, em comparação com o veículo, mantendo-se assim até o final do experimento. Foi observado também que todos os parâmetros se mantiveram constante no grupo LASSBio-596 a partir do sexto dia (Figuras 20, 21 e 22). Além disso, a TA medida no grupo LASSBio-596 ($0,054 \pm 0,012$ mm²/dia) foi significativamente menor ($p < 0,05$) que a observada no grupo veículo ($0,078 \pm 0,024$ mm²/dia), expressando o seu potencial efeito antiangiogênico, principalmente durante a segunda fase do processo angiogênico (Figura 23).

Ao avaliar a eficácia final dos tratamentos, observou-se que o LASSBio-596 teve um EI de 20,74%, calculado sobre a base de dados do grupo veículo no dia 21. Quanto à dexametasona, houve um EI de 90,81% em comparação ao grupo veículo, confirmando o seu elevado efeito antiangiogênico (Figura 25). Apesar do baixo EI do LASSBio-596 em relação à dexametasona, podemos considerar o seu potencial efeito inibitório, inclusive por tratar-se de um composto análogo da talidomida. D'Amato *et al.* (1991) investigaram, em coelhos, o efeito inibitório da talidomida e seus análogos sobre a angiogênese induzida por *pellets* contendo FGF-2. Seus resultados mostraram significativo efeito inibitório da talidomida, apesar do análogo não teratogênico Supidamida não ter apresentado qualquer atividade antiangiogênica.

Mesmo que os mecanismos das propriedades antiangiogênicas dos glicocorticóides não estejam plenamente esclarecidos, sabe-se que estas sobrevivem de duas circunstâncias, diretamente da ação na célula endotelial vascular, e indiretamente agindo sobre células com competência para produção de estímulos angiogênicos. A inibição da migração e mesmo da ativação de macrófagos, mastócitos e outros tipos celulares que originam fatores de crescimento e outros mediadores de relevância do processo angiogênico são alguns dos efeitos indiretos que se conhecem (MURATA *et al.*, 2006). De fato, o aumento da expressão de VEGF em córneas cauterizadas com nitrato de prata foi inibido pela dexametasona em 27% e 23% nas 24 e 48 horas, respectivamente, após a cauterização (EDELMAN;

CASTRO; WEN, 1999). Em relação aos efeitos diretos, estes envolvem a inibição de processos proteolíticos que promovem a degradação da membrana basal e da matriz extracelular, evento necessário para desencadear o início do processo angiogênico (MURATA *et al.*, 2006) (Figura 26).

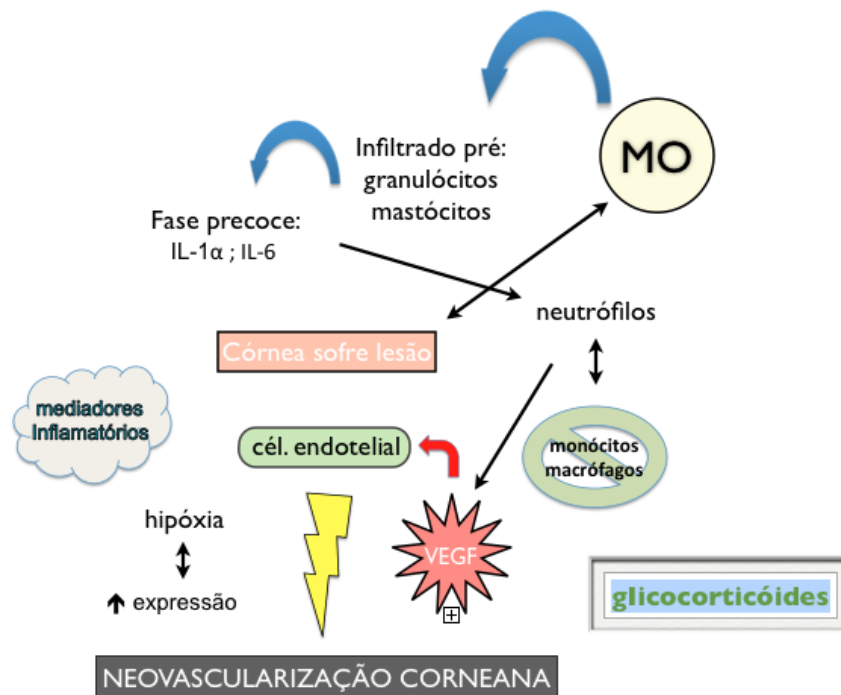


Figura 26. Representação esquemática e simplificada do mecanismo de ação dos glicocorticóides.

Neste estudo, a dexametasona foi administrada topicamente tendo sido realizada a instilação de 1 gota (40 μ l) do colírio a uma concentração de 4,0% de 8 em 8 horas, e promoveu a inibição da resposta angiogênica, de forma plena e sustentada, durante todo o experimento.

No grupo dexametasona, os valores dos quantificadores AN, CT e NV sofreram uma redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao veículo no dia três. Em todas as outras avaliações subsequentes observou-se uma redução ainda maior ($p < 0,001$) da dexametasona em relação ao veículo (Figuras 20, 21 e 22). Assim, a dexametasona inibiu completamente a angiogênese corneana inflamatória com uma TA de $-0,001 \pm 0,006$ mm²/dia que foi significativamente menor ($p < 0,001$) que o veículo e LASSBio-596 ($0,078 \pm 0,024$ mm²/dia) (Figura 23). Convém destacar que, embora a resposta inflamatória não tenha sido avaliada do ponto de vista histológico, nos animais

tratados com dexametasona, à inspeção visual, os sinais de inflamação foram bem menos intensos que os observados no veículo.

No modelo de cauterização alcalina, consegue-se induzir a formação de neovasos bem delimitados, restritos ao local de aplicação da peça de papel filtro, sem comprometer a região límbica nem as suas células germinativas. É capaz também de causar uma área de cauterização homogênea, na qual a resposta inflamatória não prejudica a quantificação dos neovasos, possibilitando avaliações sucessivas num mesmo animal. O uso de meios de contraste não é necessário mesmo na região cauterizada, pois a reação inflamatória não constitui obstáculo para a observação e quantificação dos neovasos, os quais podem ser vistos com facilidade (FECHINE-JAMACARU, 2006).

Em modelos de angiogênese corneana induzida tanto por fatores específicos como por fatores inespecíficos, como na inflamação, já foram comprovado a ação antiangiogênica dos glicocorticóides. De fato, após a identificação do fator etiológico da neovascularização, a terapêutica mais utilizada no tratamento da neovascularização corneana compõe de glicocorticóides e das drogas anti-inflamatórias não esteroidais (USUI *et al.*, 2005), associado ou não ao uso recente de anti-VEGF, além do controle do processo infeccioso em casos de ceratite infecciosa (CURSIEFEN *et al.*, 2011).

A cauterização alcalina da córnea constitui um modelo de inflamação e neovascularização que atualmente é amplamente utilizado nos estudos experimentais de angiogênese devido a sua simplicidade, além da sua facilidade de reprodução e quantificação (EDELMAN;CASTRO; WEN, 1999). Ele tem sido utilizado não só para estudar o papel de leucócitos, fatores angiogênicos e mediadores da inflamação na angiogênese inflamatória (SUNDERKÖTTER *et al.*, 1991; EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999; MOROMIZATO *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2001; ZHANG; LI; BACIU, 2002; AMBATI *et al.*, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2003; POULAKI *et al.*, 2004; SAMOLOV *et al.*, 2005; SONODA *et al.*, 2005), mas para avaliar também o efeito anti-inflamatório e/ou antiangiogênico de drogas (CONRAD *et al.*, 1994; BOCCI *et al.*, 1999; SOTOZONO *et al.*, 1999; KLOTZ *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004; KWON *et al.*, 2005). Consequentemente, tal modelo é de grande utilidade no estudo das afecções oculares de natureza

inflamatória, infecciosa ou traumática, principalmente as que cursam com neovascularização corneana (CONRAD *et al.*, 1994; EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999; KLOTZ *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2003; POULAKI *et al.*, 2004; KWON *et al.*, 2005).

Revisando-se a literatura pertinente a respeito do bloqueio isolado de TNF- α como tratamento para neovascularização da córnea, é estabelecido que o efeito angiostático de tal terapia é mínimo. Dana (2007) estudou o efeito antiangiogênico do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) em comparação com sTNFR, um receptor solúvel de TNF- α capaz de inibir ambos os receptores de TNF- α , mostrando, de acordo com o que Coxon *et al.* (2002) haviam publicado previamente, que IL-1Ra apresentou efeito angiostático significativamente maior em comparação com sTNFR.

Por outro lado, tanto a talidomida como seu análogo LASSBio-596, que são classicamente comprovados como importantes moduladores da ação de TNF- α , não agem unicamente em uma única via de sinalização. Sabe-se que modulando negativamente NF- $\kappa\beta$, a talidomida inibe o processo angiogênico, já que o NF- $\kappa\beta$ ativado apresenta expressão gênica de fatores pró-angiogênicos, tais como VEGF, FGF-2, IL-1, IL-8. Dessa forma, o LASSBio-596 apresentou ação inibidora na angiogênese inflamatória, mesmo que parcialmente, como visto no estudo, e ação anti-inflamatória devido à sua capacidade moduladora de outras citocinas, como IL-1B e IL-6 (CASQUILHO *et al.*, 2011), assim como diminuição da quimiotaxia de células inflamatórias PMN (CARVALHO *et al.*, 2010), fundamentais no processo de formação de novos vasos sanguíneos.

O estudo reforça o potencial efeito inibidor do LASSBio-596, um análogo da talidomida, sobre o processo de neovascularização, verificando que a sua TA foi significativamente inferior ao veículo ($p < 0,05$). Vale salientar que este trabalho não teve como fundamento a análise bioquímica e/ou molecular, nem citológica do processo de neovascularização corneana, mas sim o estudo da evolução do processo angiogênico relacionado ao tempo demarcado para esta pesquisa de acordo com a resposta a determinado fármaco específico utilizado.

Analizando retrospectivamente as possíveis limitações do estudo, pode-se relatar a dificuldade durante a primeira diluição do composto,

LASSBio-596, a fim de adquirir um colírio capaz de maximizar o seu efeito por aplicação tópica na córnea. De acordo com publicações prévias, o LASSBio-596 havia sido diluído em dimetilsufóxido (DMSO). Porém, como um dos objetivos específicos do presente trabalho era a sua administração por via tópica, essa diluição tornava-se inviável, pois o DMSO é um reagente comprovadamente tóxico na superfície ocular. Assim, foi necessário um estudo específico para avaliar um outro meio capaz de diluí-lo e ao mesmo tempo não provocar efeitos tóxicos e/ou irritativos oculares. Foi então que, juntamente com o Departamento de Química da UFC, foi possível elaborar um veículo para o LASSBio-596, formado pelo copolímero PE114CL20 (1,0%) e Tween 80 (0,02%). Como conservante, foi utilizado cloreto de benzalcônio (0,1%) em todos os colírios. Importante relatar que não foram observados efeitos irritativos com o colírio Veículo administrado por via tópica e com nenhum outro dos colírios em teste.

Além disso, algumas outras limitações foram observadas, entre elas, a ausência de tratamento com outras concentrações no intuito de estabelecer curvas dose-resposta, possibilitando uma análise mais apurada da eficácia dos fármacos em estudo e inclusive avaliar se o LASSBio-596 apresenta propriedade dose dependente. No entanto, o que ficou estabelecido, desde o início do projeto de pesquisa do presente estudo, foi que seria utilizado uma única concentração de 1,0%, pois, de acordo com os resultados, eles, sim, iriam direcionar, a favor ou contra, o prosseguimento do presente estudo. Neste momento, apresenta-se os primeiros resultados demonstrando o potencial efeito inibitório do LASSBio-596 na angiogênese corneana inflamatória. É de um imenso interesse dar continuidade ao estudo do efeito deste análogo da talidomida em modelos experimentais envolvendo neovascularização, permitindo uma maior compreensão dos seus efeitos sobre o processo de angiogênese.

5.1 Considerações finais

Acredita-se que os próximos estudos poderão demonstrar resultados promissores, que incluem a elaboração de colírios em diferentes concentrações. À partir deles, poderão ser respondidas algumas perguntas pertinentes que foram levantadas no presente estudo, como por exemplo:

1. Será se, em soluções de maior concentração, a resposta antiangiogênica do composto LASSBio-596 não será ampliada ?
2. Qual será seu efeito em um modelo de angiogênese *in vitro*, como o modelo de anel aórtico ou de membrana cório-alantóide (CAM) ?
3. Como será o seu mecanismo de ação molecular e bioquímico na angiogênese inflamatória? Será se seria capaz de agir nos receptores de VEGF, ou mesmo inibindo VEGF?
4. Qual será seu efeito tumoral? Será capaz de inibir a angiogênese tumoral, atuando então no crescimento de tumores?

Neste momento, apresenta-se os resultados iniciais que demonstram o potencial efeito inibitório do LASSBio-596 na angiogênese corneana inflamatória. Expressa-se o interesse em continuar estudando os efeitos desse novo análogo da talidomida em outros ensaios experimentais que envolvam neovascularização, permitindo uma maior compreensão do seu efeito no processo angiogênico. Assim, contribui-se com a ciência na descoberta de novos fármacos capazes de alterar a evolução de patologias tanto benignas quanto malignas dependentes de angiogênese.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os dados apresentados, conclui-se que o LASSBio-596, um análogo da talidomida, tem um potencial efeito inibitório, pela aplicação tópica na concentração de 1,0%, sobre a angiogênese corneana inflamatória em coelhos induzida pela cauterização alcalina com hidróxido de sódio (NaOH) *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS

ADAMIS, A. P.; AIELLO, L. P.; D'AMATO, R. A. Angiogenesis and ophthalmic disease. **Angiogenesis**, v. 3, n. 1, p. 9-14, 1999.

AMBATI, B. K.; ANADI, A.; JOUSSEN, A. M.; KUZIEL, W. A.; ADAMIS, A. P.; AMBATI, J. Sustained inhibition of corneal neovascularization by genetic ablation of CCR5. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 44, n. 2, p. 590-593, 2003.

AUERBACH, R.; LEWIS, R., SHINNERS, B.; KUBAI, L.; AKHTAR, N. Angiogenesis assays: a critical overview. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 32-40, 2003.

AVERY, R. L.; PIERAMICI, D. J.; RABENA M. D.; CASTELLARIN, A. A.; NASIR, M. A.; GIUST, M. J. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, v. 113, p. 363-372, 2006.

ARGRAVES, K. M.; WILKERSON, B. A.; ARGRAVES, W. S. Sphingosine-1-phosphate signaling in vasculogenesis and angiogenesis. **World J. Biol. Chem.**, v.1, n.10, p. 291-297, 2010.

AZAR, D. T. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing. **Trans. Am. Ophthalmol. Soc.**, v.104, p. 264-302, 2006.

BHARGAVA, P.; ROBINSON, M. O. Development of second-generation VEGFR tyrosine kinase inhibitors: current status. **Curr. Oncol. Rep.**, v. 13, p. 103-111, 2011.

BECKER, M. D.; KRUSE, E. F.; JOUSSEN, M. A.; ROHRSHNEIDER, K.; NOBILING, R.; GERBHARD, M. M.; VÖLCKER, H. E. In vivo fluorescence microscopy of corneal neovascularization. **Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 236, p. 390-398, 1998.

CAMPOS, H.S.; XISTO, D.G.; OLIVEIRA, M.B.G; TEIXEIRA, I.; NEGRI, E.M.; MAUAD, T.; CARNIELLI, D.; LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J; FAFPE, D.S.; ZIN, W.A., LAPA E SILVA, J.R.; ROCCO, P.R.M. Protective effects of phosphodiesterase inhibitors on lung function and remodeling in a murine model of chronic asthma. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 39, p. 283-287, 2006.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat. Med.**, v. 6, n. 3, p. 389-395, 2000.

CARVALHO, G. M. C.; OLIVEIRA, V. R.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; VALENÇA, S. S.; SALDIVA, P. H. N.; FAFPE, D. S.; ZIN, W. A. Can LASSBio 596 and dexamethasone treat acute lung and liver inflammation induced by microcystin-LR? **Toxicol**, v. 56, p.604-612, 2010.

CASQUILHO, N. V.; CARVALHO, G. M. C.; ALVES, J. L. C. R.; MACHADO, M. N.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; VALENÇA, S. S.; CARVALHO, A. R.; FAFPE, D. S.; ZIN, W.A. LASSBio 596 *per os* avoids pulmonary and hepatic inflammation induced by microcystin-LR. **Toxicol**, v. 58, p. 195-201, 2011.

CASTRO, M. R.; LUTZ, D.; EDELMAN, J. L. Effect of COX inhibition on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization. **Exp. Eye Res.**, v. 79, p. 275-285, 2004.

CONRAD, T. J.; CHANDLER, B. D.; CORLESS, J. M., KLINTWORTH, G. K. In vivo measurement angiogenesis of corneal with video data acquisition and computerized image analysis. **Lab. Invest.**, v. 70, n. 3, p. 426-434, 1994.

CONTI, C. J. Vascular endothelial growth factor regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. **Oncologist**, v. 7, p. 4-11, 2002.

COXON, A.; BOLON, B.; ESTRADA, J.; KAUFMAN, S.; SCULLY, S.; RATTAN, A.; DURYEYEA, D.; HU, Y.; 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 Rheum.**, v. 46, p. 2604-2612, 2002.

CROMER, W. E.; MATHIS, J. M.; GRANGER, D. N.; CHAITANYA, G. V.; ALEXANDER, J. S. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. **World J. Gastroenterol.**, v. 17, n. 5, p. 578-593, 2011.

CURSIEFEN, C.; MASLI, S.; NG, T. F.; DANA, M. R.; BORNSTEIN, P.; LAWLER, J.; STREILEIN, J. W. Roles of thrombospondin-1 and -2 regulating corneal and iris angiogenesis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45, n. 4, p. 1117-1124, 2004.

CURSIEFEN, C.; COLLIN, J.; DANA, R.; DIAZ-LLOPIS, M.; FARAJ, L. A.; GARCIA-DELPECH, S.; GEERLING, G.; PRICE, F. W.; REMEIJER, L.; ROUSE, B. T.; SEITZ, B.; UDAONDO, P.; MELLER, D.; DUA, H. Consensus statement on indications for anti-angiogenic therapy in the management of corneal diseases associated with neovascularisation: outcome of an expert roundtable. **Br. J. Ophthalmol.**, DOI: 10.1136/bjo.2011.204701, 2011.

D'AMATO, R.J.; LOUGHNAN, M.S.; FLYN, E.; FOLKMAN, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 4082-4085, 1994.

DANA, R. Comparison of topical interleukin-1 vs tumor necrosis factor-alpha blockade with corticosteroid therapy on murine corneal inflammation, neovascularization, and transplant survival (an American Ophthalmological Society thesis). **Trans. Am. Ophthalmol. Soc.**, v. 105, p. 303-343, 2007.

EDELMAN, J.L.; CASTRO, M.R.; WEN, Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression blood vessels in the rat cornea. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.40, n.6, p. 1112-1123, 1999.

ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU, V.; BAMIAS, A.; DIMOPOULOS, M. A. Thalidomide in cancer medicine. **Ann. Oncol.**, v. 15, p. 1151-1160, 2004.

ELLENBERG, D.; AZAR, D. T.; HALLAK, J. A.; TOBAIGY, F.; HAN, K. Y.; JAIN, S; ZHOU, Z.; CHANG, J. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 29, p. 208-248, 2010.

FECHINE-JAMACARU, F.V. Quantificação de angiogênese corneana in vivo através de processamento de imagens digitais. **Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Cirurgia.** Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho. 2006.

FECHINE-JAMACARU, F.V.; FECHINE JUNIOR, J.U.; MORAES FILHO, M.O.; Model of inflammatory corneal angiogenesis in rabbit cornea induced by punctual alkaline cauterization. **Acta Cir. Bra.**, v.20, p.64-73, 2005.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 280, p. C1358-C1366, 2001.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr. Rev.**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FERRARA, N.; DAMICO, L.; SHAMS, N.; LOWMAN, H.; KIM, R. Development ranibizumab, na anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. **Retina**, v. 26, p. 859-870, 2006.

FOLKMAN, J. Clinical applications of research in angiogenesis. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, n. 26, p. 1757-1763, 1995.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 16, p. 10931-10934, 1992.

GASPARINI, G.; LONGO, R.; FANELLI, M.; TEICHER, B. A. Combination of angiogenesis therapy with other anticancer therapies: results, challenges and open questions. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, n. 8, p. 1295-1311, 2005.

GRAGOUDAS, E. S.; ADAMIS, A. P., CUNNINGHAM JR., E. T.; FEINSOD, M.; GUYER, D. R. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 27, p. 2805-2816, 2004.

GONZÁLEZ, R.P.; SOARES, F.S.D.; FARIAS, R.F.; PESSOA, C.; LEYVA, A.; VIANA, G.S.B.; MORAES, M.O. Demonstration of inhibitory effect of oral shark cartilage on basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in the rabbit cornea. **Biol. Pharm. Bull.**, v.24, n.2, p. 151-154, 2001.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and merging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353-364, 1996.

HASAN, J.; SCHNYDER, S. D.; BIBBY, M.; DOUBLE, J. A.; BICKNELL, R.; JAYSON, G. C. Quantitative angiogenesis assays in vivo – a review. **Angiogenesis**, v. 7, p. 1-16, 2004.

HOLZER, M. P.; SOLOMON, K. D.; VROMAN, D. T.; SANDOVAL, H. P.; MARGARON, P.; KASPER, T. J.; CROSSON, C. E. Photodynamic therapy with verteporfin in a rabbit model of corneal neovascularization. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 44, n. 7, p. 2954-2958, 2003.

JANI, P. D.; SINGH, N.; JENKINS, C.; RAGHAVA, S.; MO, Y.; AMIN, S.; KOMPELLA, U. B.; AMBATI, B. K. Nanoparticles sustain expression of Flt intrareceptors in the cornea and inhibit injury-induced corneal angiogenesis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 48, p. 2030–2036, 2007.

JOUSSEN, A.M.; KRUSE, F.E.; VOLCKER, H.E.; KIRCHHOF, B. Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. **Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 237, p. 920-927, 1999.

JOUSSEN, A. M.; BEECKEN, W. D.; MOROMIZATO, Y.; SCHWARTZ, A.; KIRCHHOF, B.; POULAKI, V. Inhibition of inflammatory corneal angiogenesis by TNP-470. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 42, n. 11, p. 2510-2516, 2001.

KENYON, B.M; BROWNE, F.; D'AMATO, R.J. Effects of Thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. **Exp. Eye Res.**, v. 64, p. 971-978, 1997.

KLOTZ, O.; PARK, J. K.; PLEYER, U.; HARTMANN, C.; BAATZ, H. Inhibition of corneal neovascularization by α_v -integrin antagonists in the rat. **Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 238, p. 88-93, 2000.

KON, K.; FUJII, S.; KOSAKA, H.; FUJIWARA, T. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester retards vascular sprouting in angiogenesis. **Microvasc. Res.**, v. 65, p. 2-8, 2003.

KRUSE, F.E.; JOUSSEN, A.M.; ROHRSCHEIDER, K.; BECKER, M.D.; VOLCKER, H.E. Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 236, p.461-466, 1998.

KWON, Y. S.; HONG, H. S.; KIM, J. C.; SHIN, J. S.; SON, Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, p. 454-460, 2005.

LEE, P.; WANG, C. C.; ADAMIS, A. P. Ocular neovascularization: a epidemiologic review. **Surv. Ophthalmol.**, v. 43, n. 3, p. 245-269, 1998.

LIMA, L.M.; CASTRO, P.; MACHADO, A.L.; FRAGA, C.A.M.; LUGNIER, C.; DE MORAES, V.L.G.; BARREIRO, E.J. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivates, designed as new thalidomide analogues. **Bioorg. Med. Chem.**, v.10, p. 3067-3073, 2002.

LIMA, L. M.; DE LIMA, N. M. Contribuição do LASSBio[®] no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos antiasmáticos. **Rev. Virtual Quim.**, v.1, p. 35-48, 2009.

MALONNE, M.; LANGER, I.; KISS, R.; ATASSI, G. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 17, p. 1-14, 1999.

MACPHERSON, G. R.; FRANKS, M.; TOMOAI-COTISEL, A.; ANDO, Y.; PRICE, D. K.; FIGG, W. D. Current status of thalidomide and its role in the treatment of metastático prostate cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 46, p. S49-S57, 2003.

MOROMIZATO, Y.; STECHSCHULTE, S.; MIYAMOTO, K.; MURATA, T.; TSUJIKAWA, A.; JOUSSEN, A.M.; ADAMIS, A.P. CD18 and ICAM-1-dependent corneal neovascularization and inflammation after limbal injury. **Am. J. Pathol.**, v. 157, p. 1277-81, 2000.

MURATA, M.; SHIMIZU, S.; HORIUCHI, S.; TAIRA, M. Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on corneal neovascularization. **Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 244, n. 2, p. 205-209, 2006.

O'REILLY, M. S. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. In: GOLDBERG, I. D.; ROSEN, E. M. (Ed.). **Regulation of angiogenesis**. Basel: Birckäuser, cap. 11, p. 273-294. 1997.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 282, p. C947-C970, 2002.

PEPPER, M. S. Manipulating angiogenesis: from basic science to the bedside. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, p. 605-619, 1997.

POULAKI, V.; MITISIADES, N.; KRUSE, F. E.; RADETZKY, S.; ILIAKI, E.; KIRCHHOF, B.; JOUSSEN, A. M. Activin A in the regulation of corneal neovascularization and vascular endothelial growth factor expression. **Am. J. Pathol.**, v. 164, n. 4, p. 1293-1302, 2004.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671-674, 1997.

ROCCO, P. R. M.; MOMESSO, D. P.; FIGUEIRA, R. C.; FERREIRA, H. C.; CADETE, R. A.; LÉGORA-MACHADO, A.; KOATZ, V. L. G.; LIMA, L. M., BARREIRO, E. J., ZIN, W. A. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. **Eur. Resp. J.**, v.22, p. 20-27, 2003.

ROCCO, P. R. M.; XISTO, D. G.; SILVA, J. D.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N.; LUCIANO, M. N.; MEDEIROS, I. A.; CAVALCANTI, B. C.; FERREIRA, J. R. O.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. O.; CATTANI, V. B.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. LASSBio-596: da descoberta aos ensaios pré-clínicos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 2, p. 10-27, 2010.

RUSSO, J. W.; CASTELLOT JR, J. J. CCN5: biology and pathophysiology. **J. Cell Commun. Signal.**, v. 4, p. 119-130, 2010.

SAMOLOV, B.; STEEN, B.; SEREGARD, S.; VAN DER PLOEG, I.; MONTAN, P.; KVANTA, A. Delayed inflammation-associated corneal neovascularization in MMP-2- deficient mice. **Exp. Eye Res.**, v. 80, p. 159-166, 2005.

SCHUMACHER, B.; PECHER, P.; VON SPECHT, B. U.; STEGMANN, T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. **Circulation**, v. 97, p. 645-650, 1998.

SONODA, K.H; NAKAO, S.; NAKAMURA, T.; OSHIMA, T.; QIAO, H.; HISATOMI, T.; KINOSHITA, S.; ISHIBASHI, T.; Cellular events in the normal and inflamed cornea. **Cornea**, v.24, p.S50-S54, 2005.

SOTOZONO, C.; HE, J.; TEI, M.; HONMA, Y.; KINOSHITA, S. Effect of metalloproteinase inhibitor of corneal cytokine expression after alkali injury. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 10, p. 2430-2434, 1999.

SUNDERKÖTTER, C.; BEIL, W.; ROTH, J.; SORG, C. Cellular events associated with inflammatory angiogenesis in the mouse cornea. **Am. J. Pathol.**, v. 138, n. 4, p. 931-939, 1991.

TARABOLETTI, G.; GIAVAZZI, R. Modelling approaches for angiogenesis. **Eur. J. Cancer**, v. 40, p. 881-889, 2004.

THE CATT RESEARCH GROUP. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. **N. Engl. J. Med.**, DOI: 10.1056/NEJMoa1102673, 2011.

USUI, T.; SUGISAKI, K.; AMANO, S.; JANG, W. D.; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. New drug delivery for corneal neovascularization using polyion complex micelles. **Cornea**, v. 24, p. S39-S42, 2005.

WIJNGAARDEN, P. V.; COSTER, D. J.; WILLIAMS, K. A. Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. **JAMA**, v. 293, n. 12, p. 1509-1513, 2005.

YOSHIDA, S.; YOSHIDA, A.; MATSUI, H.; TAKADA, Y.; ISHIBASHI, T. Involvement of macrophage chemotactic protein-1 and interleukin 1-B during inflammatory but not basic fibroblast growth factor-dependent neovascularization in the mouse cornea. **Lab. Invest.**, v. 83, n. 7, p. 927-938, 2003.

ZARBIN, M. A.; MONTEMAGNO, C.; LEARY, J. F.; RITCH, R. Nanomedicine in ophthalmology: the new frontier. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 150, p. 144-162, 2010.

ZHANG, H.; LI, C.; BACIU, P. C. Expression of integrins and MMPs during alkaline-burn-induced corneal angiogenesis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 43. n. 4, p. 955-962, 2002.

ZHENG, M.; DESHPANDE, S.; LEE, S.; FERRARA, N.; ROUSE, B. T. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. **J. Virol.**, v. 75, p. 9828-9835, 2001.

ZHOU, S. Y.; XIE, Z. L.; XIAO, O.; YANG, X. R.; HENG, B. C.; SATO, Y. Inhibition of mouse alkali burn induced-corneal neovascularization by recombinant adenovirus encoding human vasohibin-1. **Mol. Vis.**, v. 16, p. 1389-1398, 2010.

ANEXO – Aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)