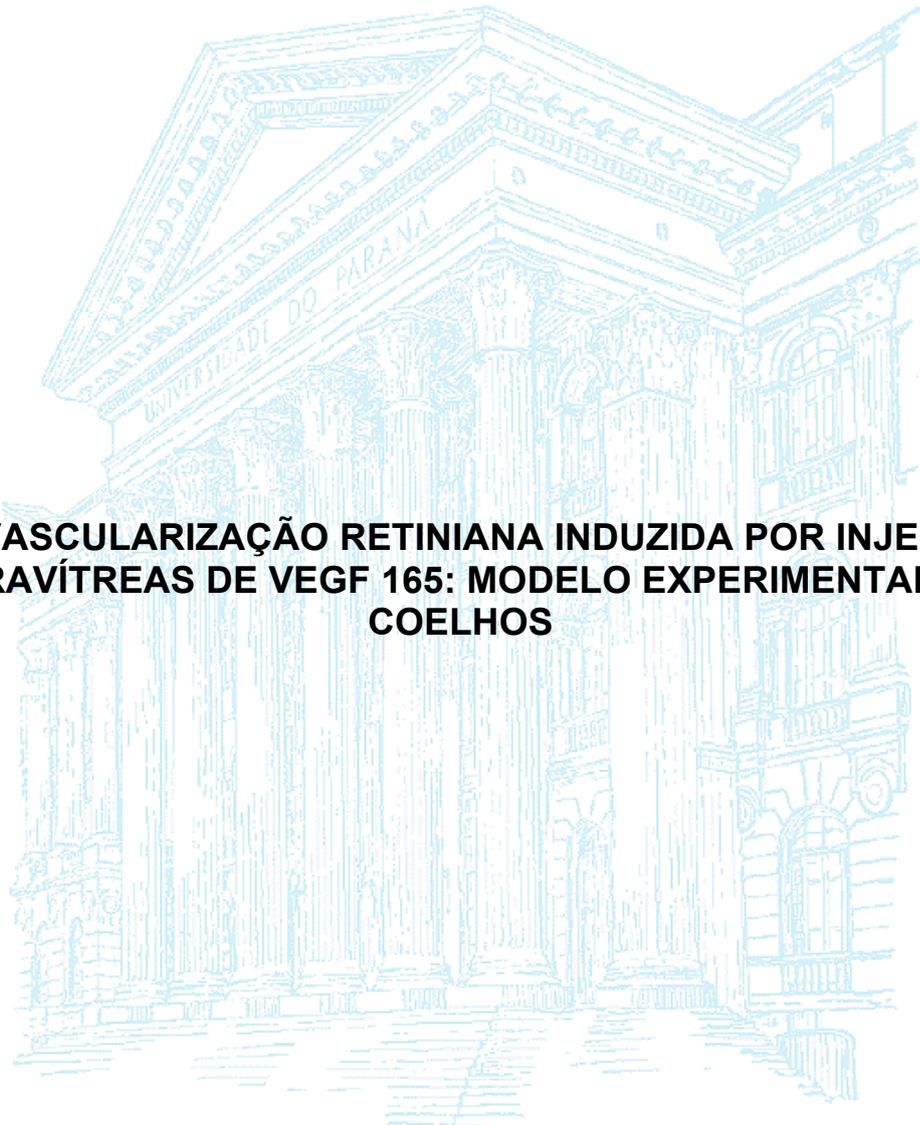


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LUÍS AUGUSTO ARANA**

**NEOVASCULARIZAÇÃO RETINIANA INDUZIDA POR INJEÇÕES  
INTRAVÍTREAS DE VEGF 165: MODELO EXPERIMENTAL EM  
COELHOS**



**CURITIBA**

**2012**

LUIS AUGUSTO ARANA

NEOVASCULARIZAÇÃO RETINIANA INDUZIDA POR INJEÇÕES INTRAVÍTREAS  
DE VEGF 165: MODELO EXPERIMENTAL EM COELHOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de grau acadêmico de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Tereza Ramos  
Moreira

Co-Orientador: Prof. Dr. Maurício Maia

CURITIBA

2012

Arana, Luís Augusto

Neovascularização retiniana induzida por injeções intravítreas de VEGF165: modelo experimental em coelhos.

Curitiba, 2012.

50 f.: il

Orientadora: Ana Tereza Ramos Moreira

Co-orientador: Maurício Maia

Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

1. VEGF 2. Neovascularização 3. Modelo animal

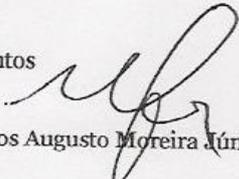


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEIS: MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 379ª  
dissertação de Mestrado do Programa de  
Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da  
Universidade Federal do Paraná, referente ao  
aluno **LUÍS AUGUSTO ARANA** com o **título**  
**NEOVASCULARIZAÇÃO RETINIANA INDUZIDA**  
**POR INJEÇÕES INTRAVÍTREAS DE VEGF 165:**  
**MODELO EXPERIMENTAL EM COELHOS** **Linha**  
**de Pesquisa:** Diagnóstico e Avaliação das  
Repercussões da Resposta Inflamatória  
Clínica e Experimental em Cirurgia **Área de**  
**Concentração:** Clínica Cirúrgica, tendo como  
orientadora Profa. Dra. Ana Tereza Ramos Moreira.

Às sete horas e trinta minutos do dia trinta de março de dois mil e doze, no auditório da CTCV no 7º andar do prédio central sala 702 do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores Daniel Vitor de Vasconcelos Santos, Mário Teruo Sato e Carlos Augusto Moreira Júnior sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof.Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Vice-coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora de Avaliação.

  
Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

  
Carlos Augusto Moreira Júnior

  
Mário Teruo Sato



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno **LUÍS AUGUSTO ARANA**

Título da Dissertação: **NEOVASCULARIZAÇÃO RETINIANA INDUZIDA  
POR INJEÇÕES INTRAVÍTREAS DE VEGF 165: MODELO  
EXPERIMENTAL EM COELHOS.**

**CONCEITOS EMITIDOS**

<b>MEMBROS</b>	<b>CONCEITO</b>	<b>EQUIVALÊNCIA</b>
Daniel Vitor de Vasconcelos Santos	A	10,0
Mário Teruo Sato	A	10,0
Carlos Augusto Moreira Júnior	A	10,0

**CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

Conceito: A Equivalência: 10,0

Curitiba, 30 de março de 2012.

<b>MEMBROS</b>	<b>ASSINATURA</b>
Daniel Vitor de Vasconcelos Santos	
Mário Teruo Sato	
Carlos Augusto Moreira Júnior	

## DEDICATÓRIA

À minha família, sem a qual nada teria sentido.

A Jayme, meu pai, meu grande exemplo a ser seguido tanto como profissional quanto pessoal.

A Ana Maria, minha mãe, pelo carinho incondicional.

A Gustavo e Eduardo, meus irmãos, pela grande amizade.

A Camilla, minha esposa, por todo o amor.

A Laís, meu maior tesouro.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Tereza Ramos Moreira pelas orientações, disponibilidade e pelos ensinamentos passados durante a minha formação oftalmológica.

Ao Prof. Dr. Mark Humayn pela amizade, orientação e a oportunidade de realizar essa dissertação.

Ao Prof. Dr. Maurício Maia pelas orientações, disponibilidade, e principalmente a amizade.

Aos meus grandes amigos Daniel, Roberta, Anderson e Camila que foram minha família em Los Angeles

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Moreira Júnior, Dr. Ezequiel Portella, Dr. Rommel Josué Zago, Dr. Fábio Alves, Dr. Alexandre Grandinetti e especialmente ao meu pai, Jayme Arana, que me guiaram na arte da oftalmologia.

Aos colegas que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho

Ao Prof. Chadder pela disponibilidade incondicional

Aos funcionários do biotério: Lynda e Carlos.

Aos dedicados funcionários e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica e em especial à Regina Sass.

À Capes pela oportunidade de atuar como bolsista desta renomada instituição.

## RESUMO

**Objetivos:** Desenvolver um modelo animal de neovascularização retiniana através de uma ou duas injeções do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) 165 na cavidade vítrea de coelhos. Avaliar esse modelo com angiografia fluorescente (AF), tomografia de coerência óptica (OCT) e análise histopatológica. **Materiais e métodos:** Doze coelhos foram divididos em três grupos. Grupo I (n=3) recebeu injeção intra-vítrea de 0.1 mL de solução salina balanceada (grupo controle). Grupo II (n=6) recebeu 10 µg de VEGF no dia 0; grupo III foi aplicado 10 µg de VEGF no dia 0 e 7. O acompanhamento (dia 0,3,7,14,21,28) incluiu fotografia colorida do fundo de olho, AF, OCT e exame histopatológico. Os olhos foram removidos e corados com hematoxilina e eosina (HE). **Resultados:** Os animais do grupo I (controle) não apresentaram alterações no globo ocular durante os 28 dias de acompanhamento. Por outro lado os olhos do grupo II (uma injeção de VEGF) demonstraram após 72 horas da aplicação dilatação e tortuosidade dos capilares retinianos, já a neovascularização foi detectada no dia 7 e regrediu na segunda semana. No grupo III (duas injeções de VEGF) o vazamento dos capilares retinianos e a neovascularização se acentuaram até o dia 14 e ao final do acompanhamento tanto a histologia como o OCT evidenciaram o descolamento de retina tracional. O estudo histopatológico demonstrou um aumento no tamanho do calibre dos vasos tanto do grupo II e III ao se comparar com o controle. **Conclusão:** Os resultados demonstram um modelo animal eficiente e confiável de neovascularização de retina pela AF, OCT e histopatologia. Uma injeção de angiogênico desenvolve a neovascularização de retina que regride após sete dias, já duas aplicações desenvolvem uma neovascularização mais intensa, que após quatro semanas evolui para o descolamento de retina.

Palavras-chave: VEGF. Neovascularização de retina. OCT. Angiofluoresceinografia. Modelo animal.

## ABSTRACT

**Purpose:** To create an animal model of retinal neovascularization using one or two injections of endothelial growth factor (VEGF 165) in the rabbit's vitreous cavity. Analyze this model with fluorescein angiography (FA), ocular coherence tomography (OCT) and histopathologic examination. **Materials and Methods:** Twelve rabbits were divided into three groups. Group I (n=3) received sham intravitreal injections of 0.1 mL of BSS. Group II (n=6) received a 10 µg intravitreal injection of VEGF165 on day 0; and those in group III (n=3) received two 10 µg intravitreal injections of VEGF165, one on day 0 and the second on day 7. Follow-up evaluations (days 0, 3, 7, 14, 21, 28) included fundus color photographs, FA, OCT and histopathologic examinations. Enucleated eyes were removed and stained with hematoxylin and eosin. **Results:** The animals of group one did not show ocular's abnormality during the follow up period. On the other hand group II was associated with dilatation and tortuosity of retina blood vessels, developing within 72 hours. Retinal neovascularization was present by day 7 and had regressed by day 14. In group III (two injections), leakage and neovascularization increased up to day 14 and by the end of follow up the OCT and histopathology findings showed a tractional retinal detachment. The histologic findings demonstrated an increase in vessel size in groups II and III when compared with control. **Conclusion:** The results demonstrated an efficient, sustainable, reliable model of retinal neovascularization as demonstrated by FA, OCT and histopathology. One injection of VEGF165 created neovascularization that peaked after 1 week. Two injections created a more intense neovascularization which, after 4 weeks, evolved to retinal detachment.

**KEYWORDS:** VEGF. Retinal neovascularization. OCT. Fluorescein angiography. Animal model.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - COMPARAÇÃO DAS CAMADAS HISTOLÓGICAS ENTRE A RETINA HUMANA E DO COELHO COM AS DEZ CAMADAS RETINIANAS. A, CORTE HISTOLÓGICO DA RETINA PERIFÉRICA HUMANA. B, CORTE HISTOLÓGICO DA RETINA PERIFÉRICA DE COELHO.....6
- FIGURA 2 – RETINOGRRAFIA E CORTE HISTOLÓGICO PRÓXIMO AO NERVO ÓPTICO A, FOTO COLORIDA DO FUNDO DO OLHO DO COELHO. B, CORTE HISTOLÓGICO NA ÁREA DEMARCADA PELA FAIXA BRANCA NA RETINOGRRAFIA DEMONSTRA A HIPERTROFIA DA CFN NA ÁREA DA FIBRA DE MIELINA AO REDOR DA CABEÇA DO DISCO ÓPTICO. A SETA PRETA DEMONSTRA A POSIÇÃO DOS VASOS RETINIANOS NA SUPERFÍCIE DAS FIBRAS DE MIELINA.....7
- FIGURA 3 – INSTRUMENTOS E A APLICAÇÃO DA INJEÇÃO INTRA-VÍTREA DE VEGF. A, SETA INDICANDO O PONTO BRANCO (10µg DE VEGF CONDENSADO ADERIDO NA PAREDE DO FRASCO). B, INSTRUMENTOS: COMPASSO, BLEFAROSTATO, PINÇA CONJUNTIVAL, SERINGA, COTONETES, CAMPO CIRÚRGICO ESTÉRIL. C, INJEÇÃO INTRA-VÍTREA.....23
- FIGURA 4 – ANGIOGRAFIA DIGITAL APÓS A APLICAÇÃO DA FLUORESCEÍNA NA ORELHA DO COELHO DO GRUPO I DURANTE O EXAME DO DIA ZERO. A, AQUISIÇÃO DAS IMAGENS DIGITAIS. B, FASE INICIAL DO ANGIOGRAMA. C, FASE INTERMEDIÁRIA. D, FASE TARDIA DA ANGIOGRAFIA.....24
- FIGURA 5 - CORTES TOMOGRÁFICOS E HISTOLÓGICOS. 1, FOTOGRAFIA DA RETINA DO COELHO IDENTIFICANDO OS CORTES TOMOGRÁFICOS NOS DIVERSOS SENTIDOS: A, RETINA JUSTAPAPILAR DA ASA MEDULAR TEMPORAL. B, RETINA JUSTAPAPILAR SUPERIOR. C, RETINA JUSTAPAPILAR DA ASA MEDULAR NASAL. D, RETINA JUSTAPAPILAR INFERIOR. 2, OLHO ENUCLUEADO COM AS FAIXAS PRETAS DELIMITANDO O LOCAL DOS CORTES HISTOLÓGICOS.....25
- FIGURA 6 - IMAGENS COLORIDAS DO FUNDO DE OLHO DOS GRUPOS I, II E III. AS IMAGENS EM CADA COLUNA MOSTRAM AS ALTERAÇÕES

FUNDOSCÓPICAS DE UM COELHO REPRESENTANTE DE CADA GRUPO EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES PERÍODOS DO ACOMPANHAMENTO. ACHADOS SEMELHANTES FORAM OBSERVADOS EM ANIMAIS DENTRO DE CADA GRUPO. GRUPO I, INJEÇÃO DE BSS. GRUPO II, UMA INJEÇÃO DE VEGF NO DIA ZERO. GRUPO III, DUAS INJEÇÕES DE VEGF: DIA ZERO E SETE. AS SETAS BRANCAS MARCAM A DILATAÇÃO E AUMENTO DA TORTUOSIDADE DOS VASOS. JÁ AS SETAS AMARELAS EVIDENCIAM NO GRUPO III A HEMORRAGIA RETINIANA NO 14º DIA ALÉM DAS DOBRAS NA CAMADA DE FIBRAS DE MIELINA AO 28º DIA. ....27

FIGURA 7 - FASE INICIAL DA ANGIOGRAFIA FLUORESCÉINICA NOS TRÊS GRUPOS. CADA COLUNA REPRESENTA UM ANIMAL DE CADA GRUPO NUM DETERMINADO DIA DO ACOMPANHAMENTO. ACHADOS SEMELHANTES FORAM OBSERVADOS EM ANIMAIS DENTRO DE CADA GRUPO O ÁPICE DA FORMAÇÃO NEOVASCULAR NO GRUPO II É NO 7º DIA, ENQUANTO ESSE PICO OCORRE NO 14º DIA DO GRUPO III. NO 28º DIA DO GRUPO II A TORTUOSIDADE CAPILAR AINDA PERMANECE (SETA BRANCA COMPARA A TORTUOSIDADE NO PRIMEIRO E ÚLTIMO DIA). JÁ NO GRUPO III DESDE O 21º DIA EXISTE UMA MÁ PERFUSÃO JUSTAPAPILAR, ESPECIALMENTE NA REGIÃO INFERIOR QUE PERMANECE ATÉ O 28º DIA (SETA MAIOR).....29

FIGURA 8 - ANGIOGRAFIA DA ASA MEDULAR, PERIFERIA RETINIANA E DO SEGMENTO ANTERIOR. NO 7º DIA EXISTE NEOVASCULARIZAÇÃO E EXSUDAÇÃO NA RETINA E IMPORTANTE VAZAMENTO DOS VASOS IRIANOS DOS GRUPOS SUBMETIDOS À INJEÇÃO DO VEGF (SETAS BRANCAS). JÁ AO 28º DIA EXISTE UMA REGRESSÃO DESSES SINAIS, PORÉM NA ASA MEDULAR DO GRUPO III NOTA-SE *SHUNTS* ARTERIOVENOSOS, VENO-VENOSOS E UMA REGRESSÃO DA ARQUITETURA VASCULAR (SETAS AMARELAS).....30

GRÁFICO 1 - RELAÇÃO ENTRE OS TRÊS GRUPOS COM A ESPESSURA RETINIANA E O TEMPO DE SEGMENTO. GRUPO I, A ESPESSURA RETINIANA SE MANTEVE CONSTANTE. GRUPO II, AUMENTO DA ESPESSURA ATÉ O SÉTIMO DIA. JÁ NO GRUPO III O ÁPICE OCORREU NO 14º DIA REGREDINDO AO LONGO DOS DIAS. ....31

FIGURA 9 - ACHADOS TOMOGRÁFICOS COMPARANDO O GRUPO II (A) E III (B) NOS DIAS 0, 3, 7, 14 E 28, RESPECTIVAMENTE 1, 2, 3, 4 E 5. A, SETA BRANCA EVIDENCIA O PADRÃO O AUMENTO DO DIÂMETRO DOS VASOS ATÉ

O DIA 7 (A3) E SUA REGRESSÃO NO DECORRER DO PERÍODO DE ACOMPANHAMENTO. B, SETA AMARELA DEMONSTRA A EVOLUÇÃO DOS VASOS RETINIANOS DO DIA 0 (B1) ATÉ A FORMAÇÃO DO DR NO DIA 28 (B5).

.....32

FIGURA 10 - CORTES HISTOLÓGICOS (MAGNIFICAÇÃO 10X) COM IMPREGNAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA DOS TRÊS GRUPOS NO 28º DIA. A, CORTE HISTOLÓGICO DA RETINA JUSTAPAPILAR EVIDENCIANDO A VEIA E ARTÉRIA SOBRE A SUPERFÍCIE RETINIANA DO GRUPO I . B, HISTOLOGIA DO GRUPO II NO QUAL ENCONTRAMOS VASOS MAIS CALIBROSOS E NUMEROSOS (SETAS). C, PRESENÇA DE UM DESCOLAMENTO DE RETINA TRACIONAL NO QUAL É POSSÍVEL VERIFICAR O TECIDO NEOVASCULAR TRACIONANDO A RETINA NO GRUPO III. ....33

FIGURA 11 - CORRELAÇÃO ENTRE RETINOGRAFIA, HISTOLOGIA E TOMOGRAFIA ÓPTICA DO GRUPO III NO 14º DIA (A, B) E NO 28º DIA (C). A1, RETINOGRAFIA DEMONSTRANDO O LOCAL DO CORTE TOMOGRÁFICO (LINHA BRANCA). A2, CORTE TOMOGRÁFICO E A3, CORTE HISTOLÓGICO DELIMITANDO O TECIDO NEOVASCULAR SOBRE A RETINA (SETAS). B1, RETINOGRAFIA EVIDENCIANDO O SÍTIO DO CORTE TOMOGRÁFICO. B2 E B3, PONTOS DE TRAÇÃO VÍTREO-RETINIANA DETECTADOS TANTO NO OCT QUANTO NA HISTOLOGIA (SETAS). C1, FOTOGRAFIA DO FUNDO DE OLHO. C2 E C3, DESCOLAMENTO DE RETINA AO 28º DIA VERIFICADO TANTO NO CORTE TOMOGRÁFICO QUANTO NO HISTOLÓGICO (SETAS DEMARCAM O CONTORNO DA RETINA QUE SE DOBROU SOBRE A CAMADA DE FIBRAS NERVOSAS). ....34

## LISTA DE SIGLAS

AF	Angiofluoresceinografia / Angiografia
aFGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto ácido
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto básico
BSS	Solução Salina Balanceada
CNE	Camada Nuclear externa
CPE	Camada Plexiforme externa
CNI	Camada Nuclear Interna
CPI	Camada Plexiforme Interna
CG	Camada Ganglionar
CFN	Camada de Fibras Nervosas
CFR	Camada de Fotorreceptores
DMRI	Degneração Macular Relacionada a Idade
DR	Descolamento de Retina
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EPR	Epitélio Pigmentar da Retina
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
H.E.	Hematoxilina-Eosina
HIF	Fator Induzido por Hipóxia
IGF	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
IL	Interleucina
MLE	Membrana Limitante Externa
MLI	Membrana Limitante Interna
NV	Neovascularização
OCT	Tomografia de Coerência Óptica
PEDF	Fator de Crescimento do Epitélio Pigmentado
RDP	Retinopatia Diabética Proliferativa
TGF	Fator de Transformação do crescimento
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VPF	Fator de Permeabilidade Vascular

## LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μm	Micrômetro
nm	Nanômetro
mm	Milímetros
®	Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVO.....	2
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 RETINA .....	3
2.1.1 Retina Humana.....	3
2.1.2 Retina de Coelho.....	5
2.2 EXAMES PARA O ESTUDO DA RETINA.....	8
2.2.1 Angiografia Fluorescente.....	8
2.2.2 Tomografia de Coerência Óptica.....	9
2.3 ANGIOGÊNESE.....	10
2.3.1 Angiogênese Patológica.....	11
2.3.2 Fatores Angiogênicos.....	13
2.3.3 Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular.....	14
2.4 MODELOS DE NEOVASCULARIZAÇÃO RETINIANA.....	16
2.5 DOENÇAS VASCULARES DA RETINA.....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 Delineamento da Pesquisa.....	21
3.2 Animais e Local de Estudo.....	21
3.3 Grupos em estudo.....	21
3.4 Injeções Intravítreas.....	22
3.5 Seguimento.....	23
3.6 Análise Estatística.....	26
<b>4 RESULTADOS</b> .....	27
4.1 Retinografia.....	27
4.2 Angiografia.....	28
4.3 Tomografia de Coerência Óptica.....	30
4.4 Histopatologia.....	32
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

A formação de novos vasos ocorre tanto em situações fisiológicas como a embriogênese, o ciclo reprodutivo feminino e o processo de reparação tecidual, quanto em situações patológicas. (CARMELIET, 2003; CLEAVER,; MELTON, 2003). O crescimento tumoral e metastático, assim como doenças vasculares no fundo de olho (retinopatia diabética, degeneração macular, retinopatia da prematuridade, oclusões vasculares), estão relacionados com a angiogênese patológica (FOLKMAN, 1971; CARMELIET, 2003). Tais doenças vasculares são as principais causas de cegueira no mundo (KLEIN, 1984). Evidências clínicas e experimentais comprovam a associação entre a neovascularização encontrada nas doenças vasculares da retina com o aumento dos níveis de VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), especialmente o subtipo VEGF A165 (AIELLO et al., 1994; WELLS et al., 1996).

Com o surgimento das terapias intraoculares anti-VEGF (bevacizumab - Avastin® - e - ranibizumab - Lucentis®; Genentech, Inc, San Francisco, USA), ocorreu um notório benefício no tratamento das patologias oculares citadas previamente (ROSENFELD et al., 2006; SOHEILIAN et al., 2009). Entretanto, vários pontos precisam ser esclarecidos a respeito dessas e, principalmente, das novas drogas antiangiogênicas que surgirão, dentre eles a duração da ação, a toxicidade, a eficácia e a dose ideal.

No intuito de compreender melhor os mecanismos da angiogênese, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas para modular e inibir a neovascularização patológica. Desta maneira, a criação de um modelo experimental de neovascularização retiniana com o VEGF165 (a principal isoforma da neovascularização ocular) é relevante para avaliar os tratamentos atuais e futuros.

## 1.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é desenvolver um modelo animal de neovascularização retiniana por meio de uma ou duas injeções do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) 165 na cavidade vítrea de coelhos, além de avaliar esta neovascularização por retinografia, angiografia, tomografia de coerência óptica e histologia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Retina

#### 2.1.1 Retina Humana

A palavra retina tem origem no termo latino *rete*, que significa “rede”. A retina é um tecido fino, delicado e transparente, composto por células de origem neuroectodérmica, é um prolongamento do sistema nervoso central. Na retina, existem células especializadas que absorvem a luz e a transformam em estímulos nervosos, que são levados pelo nervo óptico para o cérebro, no qual ocorre a compreensão da imagem. A espessura retiniana varia de 0,56 mm a 0,1 mm. Em sua superfície interna, encontra-se o corpo vítreo; externamente, existe a coróide, a túnica vascular do globo ocular.

O suprimento metabólico da retina é promovido por duas vias: artéria central da retina e seus ramos, que nutrem os dois terços da retina interna, e a coriocapilar (segmento mais interno da coróide), que nutre a porção mais externa da retina. A artéria central da retina penetra o nervo óptico um centímetro atrás do globo ocular. Ela emerge do disco óptico e se divide em quatro ramos que se espalham na retina desde a membrana limitante interna até a camada nuclear interna (HOGAN et al., 1971). O restante da retina neurosensorial, bem como o epitélio pigmentar retiniano (EPR), é nutrido pela coriocapilar, uma camada única de capilares coroidianos contendo endotélio fenestrado que permite a passagem dos nutrientes. As veias retinianas deixam a retina pela veia central que atravessa o disco óptico e entra no seio cavernoso ou na veia oftálmica superior.

A topografia da retina pode-se distinguir em duas zonas: a central, de 5 a 6 mm de diâmetro, que compreende a área macular responsável pela visão de detalhes, e a zona mais externa, que corresponde à retina periférica. A retina é composta pela porção neurosensorial (9 camadas) e uma camada mais externa:

epitélio pigmentar retiniano (EPR). Essas camadas podem ser facilmente observadas numa preparação histológica (Figura 1A) e podem ser assim descritas, conforme HOGAN et al. (1971):

1) O Epitélio pigmentar retiniano (EPR) é formado por uma única camada de células cubóides fundamental para o metabolismo retiniano. Forma a barreira hemato-retiniana externa entre a coróide e a retina neurosensorial, participa do metabolismo da vitamina A e da fagocitose dos segmentos externos dos cones e bastonetes, além de conter grânulos de melanina que absorvem a luz e evitam a reflexão da mesma no interior do globo ocular.

2) A Camada de fotorreceptores (CFR) é formada pelos segmentos internos e externos de dois tipos de células, cones e bastonetes, responsáveis pela transdução, ou seja, a transformação da luz em impulsos elétricos. O segmento interno de fotorreceptores é formado, basicamente, por organelas celulares que geram a energia necessária ao segmento externo no qual se concentra o pigmento visual que capta a luz.

3) A Membrana limitante externa (MLE) é uma delicada estrutura com fenestrações pelas quais passam fibras oriunda dos cones e bastonetes. Essa membrana é formada pelos complexos juncionais das células de Muller e células fotorreceptores adjacentes.

4) A Camada nuclear externa (CNE) contém os núcleos de fotorreceptores.

5) A Camada plexiforme externa (CPE) é onde os axônios dos cones e bastonetes entram em sinapse com os dendritos das células bipolares e horizontais.

6) A Camada nuclear interna (CNI) é formada pelos núcleos de cinco tipo celulares: horizontais, amácrimas, bipolares, Muller e interplexiforme. As células horizontais, assim como as amácrimas, não são neurônios típicos, mas ajudam a modular o estímulo elétrico. As células bipolares são neurônios de primeira ordem e fazem a conexão com os fotorreceptores. As células de Muller são responsáveis pelo suporte estrutural, uma vez que ocupam toda a espessura da retina. Além disso, são essenciais para a o isolamento das sinapses retinianas, assim como a absorção e transporte de metabólicos (glicose) e sua posterior distribuição.

7) A Camada plexiforme interna (CPI) representa a junção entre os neurônios da 1ª e 2ª ordem, respectivamente os axônios das células bipolares e os dendritos das células ganglionares. É o local onde as interações modulam o estímulo que será levado ao cérebro e a segunda – e última – região sináptica da retina.

8) A Camada ganglionar (CG) é constituída pelos corpos das células ganglionares.

9) A Camada de fibras nervosas (CFN) consiste nos axônios das células ganglionares que se distribuem em feixes de fibras amielínicas paralelamente à superfície da retina, convergindo para o disco óptico e formando o nervo óptico.

10) A Membrana limitante interna (MLI) é uma fina camada de 0,5 micra de espessura situada entre a retina e o vítreo. É formada pelas terminações das células de Muller e fibras do colágeno que originam o vítreo.

### 2.1.2 Retina de Coelho

Os coelhos são mamíferos de fácil manipulação e adequados para pesquisa ocular, sendo as fêmeas mais facilmente manipuláveis. Apesar da anatomia dos olhos de coelhos apresentar algumas peculiaridades, não há muitas diferenças significativas em relação às estruturas oculares de humanos. O cristalino dos olhos dos coelhos apresenta um diâmetro ântero-posterior grande, estendendo-se até a cavidade vítrea e, portanto, limitando o diâmetro ântero-posterior da cavidade vítrea a poucos milímetros (PRINCE, 1964). Por esta razão, necessita-se cautela durante a injeção intravítrea pela possibilidade de toque cristalino durante o procedimento.

Apesar da similaridade histológica da retina de coelhos e humanos (Figura 1), é necessário destacar que a retina de coelhos apresenta duas peculiaridades anatômicas visíveis à patologia macroscópica que lhe conferem características especiais e são achados anatômicos importantes para a experimentação científica: a camada de fibras nervosas e os vasos retinianos.

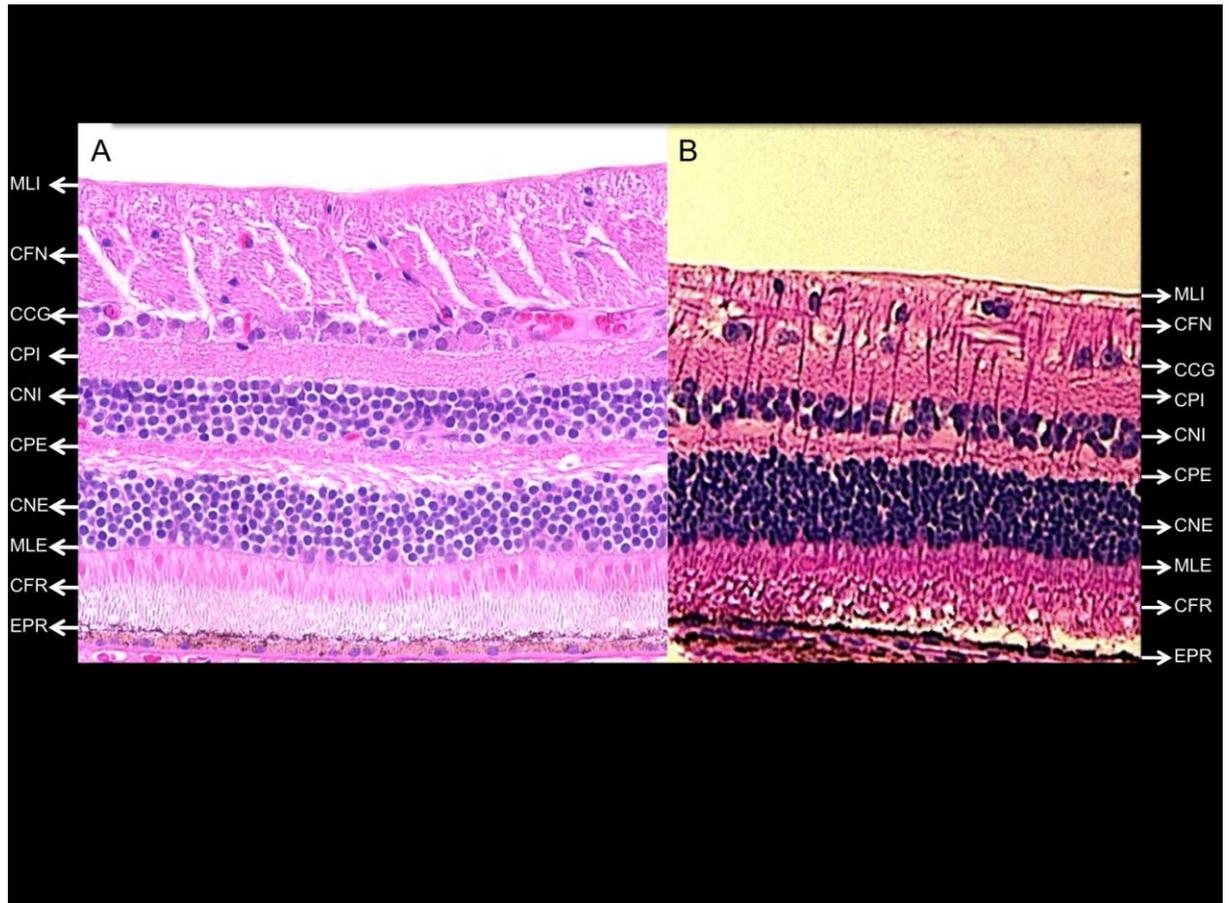


Figura 1. Comparação das camadas histológicas entre as retinas humana e do coelho com as dez camadas retinianas. A, Corte histológico da retina humana. B, Corte histológico da retina de coelho.

O coelho apresenta um disco óptico localizado no terço superior da retina, mais ovalado e com uma grande escavação central. Oriundas do disco óptico existem duas faixas brancas, uma orientada para o setor nasal e a outra, para o temporal. Ambas são constituídas de fibras de mielina que diminuem à medida que se aproximam da periferia (Figura 2A). Esta característica fundoscópica dos coelhos é denominada raios medulares, uma estrutura anatômica composta pelos axônios mielinizados das células ganglionares que se estende cerca de 2-4 mm superior e inferiormente. A vascularização nos coelhos é, de certa forma, semelhante a dos humanos, já que os vasos centrais da retina (artéria e veia) penetram e deixam o globo ocular através da cabeça do nervo óptico. Entretanto, os vasos retinianos estendem-se temporalmente e nasalmente ao nervo óptico em sentido horizontal, ao longo dos raios medulares peri-papilares na interface vítreo-retiniana (figura 2A). O restante da retina é, de certa forma, avascular, já que sua nutrição depende da coriocapilar.

De acordo com PRINCE (1964), o estudo histológico em olhos de coelhos demonstra uma estrutura semelhante à humana num corte que não compreende o raio medular e uma hipertrofia da camada de fibras nervosas na região do raio medular (Figura 2B). Os componentes celulares encontrados no coelho são: EPR (maiores se comparados ao epitélio pigmentar da retina de humanos); fotorreceptores (basicamente compostos por bastonetes e, com menor frequência, cones atípicos), células horizontais, bipolares, amácrinas, ganglionares e as de Muller (presentes difusamente pela retina). Entretanto, na retina dos coelhos pode detectar-se células que não encontramos em humanos, como as células gigantes localizadas na camada nuclear interna.



**Figura 2** – Retinografia e corte histológico próximo ao nervo óptico. **A**, Foto colorida do fundo do olho do coelho. **B**, Corte histológico na área demarcada pela faixa branca na retinografia demonstra a hipertrofia da CFN na área da fibra de mielina ao redor da cabeça do disco óptico. A seta preta demonstra a posição dos vasos retinianos na superfície das fibras de mielina.

## 2.2 Exames para o estudo da retina

### 2.2.1 Angiografia Fluorescente

Surgida em 1961, a angiofluoresceinografia é um exame que se baseia na injeção de fluoresceína sódica na corrente sanguínea para avaliar e documentar, por fotos e vídeos, a dinâmica da circulação retiniana. Além disso, permite avaliar as condições do epitélio pigmentado da retina.

A fluoresceína sódica é uma substância fluorescente, ou seja, ao ser exposta a uma radiação eletromagnética de determinado comprimento de onda, emite luz de comprimento de onda pouco maior. Isso se dá em função da absorção de parte da energia radiante, promovendo excitação molecular com os elétrons passando para um nível energético maior, liberando a energia absorvida sob a forma de fluorescência. Para que esse processo ocorra, o retinógrafo emite um flash de luz que estimula a fluoresceína nos vasos retinianos e que, ao ser estimulada, emite uma luz verde que será refletida no retinógrafo, o qual seleciona apenas a luz fluorescente para formar a imagem angiográfica. Dependendo do sistema de captura do retinógrafo, também é possível realizar a fotografia colorida da retina, ou seja, a retinografia.

O tempo decorrido entre a injeção do contraste e o surgimento dele na artéria retiniana varia de 8 a 12 segundos. As fases do angiograma progridem da seguinte forma: coroidiana (fluorescência difusa sem contraste nos vasos retinianos), arterial, venosa precoce, capilar (contraste tanto nas artérias como nas veias), venosa tardia (ausência de contraste nas artérias) e tardia, que se caracteriza pela ausência de contraste nos ramos vasculares retinianos. Didaticamente, os achados angiográficos são divididos em hipofluorescência e hiperfluorescência (MAIA, 2003).

A hipofluorescência pode ocorrer por bloqueio da fluoresceína, por exemplo, uma hemorragia pré-retiniana que impede a visualização do contraste dentro dos vasos retinianos. Além disso, as proliferações do EPR, como acontece no nevus de coróide e coriorretinites cicatrizadas, podem criar uma hipofluorescência. Outra causa desse achado angiográfico é a interrupção do trânsito sanguíneo tanto arterial ou venoso, como ocorre nas oclusões vasculares. Já a hiperfluorescência se caracteriza pelo aumento da fluoresceína em determinada área em relação às

circunvizinhas. Destaca-se o efeito em janela, no qual, pela degeneração ou atrofia do EPR (degeneração macular atrófica e distrofias retinianas), o contraste presente nos vasos coroídeos é destacado. Outra causa de hiperfluorescência é o acúmulo de contraste no espaço sub-retiniano (membrana neovascular na degeneração macular exsudativa) e intraretiniano (edema macular do diabético). Os vasos neoformados, encontrados em casos de retinopatia proliferativa, apresentam uma hiperfluorescência marcante devido ao intenso e extenso vazamento do contraste.

Talvez a melhor indicação deste exame seja para o paciente diabético, já que é possível avaliar áreas de não perfusão capilar e edema macular, além de detectar microaneurismas e, especialmente, neovasos, o que muda completamente o tratamento nesses pacientes, uma vez que receberão tratamento para retinopatia diabética proliferativa.

### 2.2.2 Tomografia de Coerência Óptica

A tomografia de coerência óptica (OCT) é um exame de alta resolução não-invasivo e de não-contato, que utiliza a luz próxima ao infravermelho (840nm) num sistema de interferometria e produz imagens seccionais da retina. Pela sua alta resolução, a nitidez da imagem tomográfica é comparada àquela obtida por meio da microscopia óptica, comparando-se a uma biópsia *in vivo*. O OCT permite aplicações em diversas áreas da medicina, já que a luz infravermelha pode ser apresentada por meio de um cateter e usada, praticamente, em todo lugar do corpo. Existem diversos relatos do uso dessa tecnologia para avaliar placas ateroscleróticas na cardiologia, além de sua precisão também na dermatologia, oncologia e gastroenterologia (ZYSK et al., 2007; OSIAC et AL., 2011).

O princípio de formação da imagem do OCT é similar ao do ultrassom, com a exceção de que, neste caso, é empregada a luz ao invés do som. Outra diferença é a resolução do OCT que chega a ser de 10 a 15 vezes superior ao ultrassom.

Entretanto, como a penetração da luz nos tecidos é muito limitada em opacidades de meios, a detecção das imagens não se faz possível, ao contrário do ultrassom.

A luz, quando incide em um meio não transparente como a retina, pode ser transmitida, absorvida ou refletida. A aquisição de imagens pelo OCT baseia-se na técnica de interferometria de baixa coerência, na qual um interferômetro óptico usa o princípio de comparação entre diferentes feixes de luz, o que possibilita a medição das estruturas. Um dos feixes é refletido e outro transmitido ao olho, sendo refletido nas estruturas oculares. O feixe de luz refletido do olho consiste de múltiplos ecos que informam a distância e a espessura das diferentes estruturas intraoculares. Já o segundo feixe é refletido a partir de um espelho que serve como referência. A chave do processo consiste no fato de que o interferômetro pode medir o tempo de atraso dos ecos ópticos pela comparação do feixe de luz refletivo com um feixe-padrão (FARAH et al., 2010). O uso desta tecnologia permitiu um importante salto no diagnóstico e monitorização das doenças oculares relacionadas com a neovascularização patológica, especialmente o diabetes e a degeneração macular relacionada à idade (AL-LATAYFEH; SUN; AIELLO, 2010; RITTER et al., 2011).

### 2.3 Angiogênese

Os vasos sanguíneos são formados por dois processos distintos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese envolve a diferenciação de células endoteliais precursoras do mesoderma; já os novos vasos da angiogênese são gerados por vasos preexistentes. A vasculogênese está presente apenas durante o desenvolvimento embrionário e origina a formação do primeiro plexo vascular. Mais tarde, esses canais endoteliais de tamanhos uniformes são remodelados num sistema mais complexo constituído de grandes e pequenos vasos (VEIKKOLA; ALITALO, 1999). Os novos capilares são formados por meio da angiogênese, tanto por brotamento, como por divisão (intussuscepção) de seus vasos de origem (RISAU, 1997). Em adultos, a angiogênese é essencial no ciclo reprodutivo, bem

como na reparação, remodelagem e regeneração dos tecidos, por exemplo, no processo de cicatrização de feridas.

A angiogênese é resultado de uma complexa interação entre fatores de crescimento, células endoteliais vasculares, moléculas de matriz extracelular, quimiocinas e moléculas de sinalização celular. O alvo dos fatores angiogênicos são os capilares e vênulas terminais.

O processo de angiogênese pode ser dividido, didaticamente, em etapas: 1) liberação de fatores de crescimento angiogênico pelo tecido afetado; 2) ligação dos fatores angiogênicos ao complexo vascular de células endoteliais adjacentes; 3) ativação das células endoteliais para a produção de enzimas; 4) dissolução da membrana basal adjacente pela ação das enzimas; 5) proliferação e migração das células endoteliais; 6) adesão de moléculas (integrinas) que servem de suporte para o avanço das células endoteliais; 7) dissolução e remodelação de tecido com matriz de metaloproteinases; 8) formação de tubos vasculares pelas células endoteliais; 9) formação de vasos celulares em laço; 10) estabilização de novos vasos sanguíneos por células musculares lisas e pericitos. Acredita-se que as terapias antiangiogênicas atuais podem inibir a angiogênese em diferentes estágios desse processo (BLUMENKRANZ; MOSHFEGHI, 2006).

### 2.3.1 Angiogênese Patológica

O organismo controla a angiogênese pelo balanço preciso entre os fatores de crescimento e inibidores da angiogênese. Quando este balanço é quebrado, pode resultar em condições fatais e debilitantes (CARMELIET; JAIN, 2000; PATERNOSTRO; DAVID; PAROLA, 2010) tanto pela exacerbação, quanto pela insuficiência de angiogênese. Dentre essas doenças angiogênese-dependentes proliferativas, encontram-se tumores, doenças reumatológicas, oculares (retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, retinopatia da prematuridade, oclusão venosa de retina, glaucoma neovascular e neovascularização corneana)

(SZEKANECZ (et al., 2009). Por outro lado, dentre as doenças decorrentes da angiogênese insuficiente destacam-se: isquemia cerebral e miocárdica, além de úlceras cutâneas crônicas (CARMELIET, 2003).

Existe uma relação marcante entre a angiogênese patológica e câncer, uma vez que a vascularização acentuada é uma condição essencial para que ocorra o desenvolvimento neoplásico (PINHO, 2005). Além disso, existem fortes evidências de que a neovascularização também é importante no processo de formação e desenvolvimento de metástases (CARMELIET; JAN, 2000).

A angiogênese patológica no globo ocular pode afetar tanto a túnica externa (córnea), média (íris e coróide) e interna, no caso, a retina (KEATING; JACOBS, 2011). O comprometimento crônico do suprimento sanguíneo do tecido retiniano nas vasculopatias, por exemplo, retinopatia diabética e oclusões venosas, gera isquemia desse tecido. Essas áreas induzem à produção de fatores angiogênicos que são responsáveis pela neovascularização retiniana.

Esses novos vasos, pela imaturidade dos seus capilares, podem sangrar, perder líquido e proteínas e, conseqüentemente, levar a hemorragias e edema do tecido retiniano subjacente. Conforme aumenta o número de neovasos, também se acentua a isquemia pela incapacidade funcional dos novos vasos. Os neovasos da retina podem crescer sobre o vítreo, formando estruturas fibrovasculares que, posteriormente, podem contrair e gerar hemorragias e descolamento de retina.

A neovascularização retiniana apresenta uma característica ímpar no corpo humano, já que os neovasos podem ser encontrados no espaço epiretiniano, intrarretiniano e sub-retiniano. Nos dois primeiros subtipos, os neovasos se originam na retina. Já no terceiro, a neovascularização ocorre, classicamente, na coróide e, após penetrar a membrana de Bruck e EPR, cresce para o espaço sub-retiniano. Entretanto, alguns autores demonstram essa topografia da neovascularização originada de vasos retinianos (FREUND et al., 2008). Independente do local de origem da neovascularização no fundo de olho, inúmeros estudos científicos e observações clínicas correlacionam a angiogênese patológica à hipóxia.

### 2.3.2 Fatores Angiogênicos

Nas doenças oculares, assim como no crescimento tumoral e cicatrização de feridas, a hipóxia aparece como o precursor comum da neovascularização (KNIGHTON, et al., 1983; FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987). Nas décadas de 1940 e 1950, diversos autores postularam que a neovascularização retiniana era causada pela liberação de um "fator vasoproliferativo" da retina em resposta a hipóxia (ASHTON et al., 1954). Desde esta hipótese inicial, tem sido amplamente aceito que a hipóxia retiniana resulta na liberação de fatores que influenciam no crescimento de novos vasos sanguíneos (PATZ, 1982).

O fator inicialmente relacionado à indução de novos vasos foi o fator de crescimento fibroblástico (FGF) básico e ácido. Posteriormente, diversos elementos foram identificados com a angiogênese: o fator de crescimento do epitélio pigmentado (PEDF), as angiopoetinas, o fator derivado das plaquetas (PDGF), o fator induzido por hipóxia (HIF-1), o fator de transformação do crescimento  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), o fator de crescimento epidérmico (EGF), a interleucina 1 (IL-1) e a interleucina 2 (IL-2), e o fator de permeabilidade vascular (VPF), atualmente conhecido como fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (FOLKMAN; SHING, 1992; GRANT et al., 1993; VALIATTI et al., 2011). Logo, vários fatores são envolvidos na dinâmica e complexa malha angiogênica.

O fator de crescimento de fibroblasto (FGF) pertence a uma família de fatores de crescimento contendo mais de vinte membros, dos quais o FGF ácido (aFGF) e o FGF básico (bFGF) são os mais estudados (QAZI et al., 2009). Os FGF são reconhecidos por uma família de receptores de superfície celular que tem atividade tirosina cinase intrínseca com atuação na angiogênese – especialmente o bFGF, que serve como modelo de indução à neovascularização ocular em coelhos (KIMURA, 1995).

Já o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) é de uma família de várias proteínas intimamente relacionadas. Cada uma consiste em duas cadeias, designadas de A e B. O PDGF apresenta três isoformas, sua ação consiste na

proliferação de fibroblastos, células musculares lisas e monócitos (TALLQUIST, 2004).

A família das angiopoetinas são fatores de crescimento que incluem quatro membros (de Ang-1 a Ang-4), os quais se ligam ao receptor tirosina quinase Tie2. As angiopoetinas aumentam a sobrevivência das células endoteliais e a morfogênese capilar, além de limitar a permeabilidade capilar. Enquanto as Ang-1 e Ang-4 são ativadoras do receptor Tie 2, a Ang-2 e Ang-3 agem inibindo a ativação desse receptor. O fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) é uma glicoproteína que regula o crescimento vascular na retina. Secretado pelas células ganglionares e pelas células do EPR, ele inibe a angiogênese em modelos animais e culturas de células (AIELLO et. al., 1994). Ao contrário do VEGF, sua expressão é estimulada pela maior tensão local de oxigênio e inibida pela hipóxia, o que confere um papel de possível antagonista natural do VEGF (DAWSON et al.; 1999). O fator transformador de crescimento- $\beta$  pertence à família de polipeptídeos homólogos que incluem três isoformas (TGF- $\beta$  1, 2, 3), produzidas por uma variedade de tipos celulares como plaquetas, células endoteliais, linfócitos e macrófagos. Além da função de quimiotáticos aos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos o TGF-  $\beta$  desempenha um papel importante na regulação da expressão da integrina e diversas citocinas (PEPPER, 1997).

O fator de crescimento do endotélio vascular é universalmente aceito como o regulador primário da permeabilidade da malha vascular do corpo humano. É amplamente estudado devido ao seu papel na angiogênese e linfangiogênese (PENN et al., 2008), especialmente a função patológica do VEGF que, com sua inibição (anti-VEGF), proporciona tratamento para o câncer e diversas doenças oftalmológicas (BHISITKUL, 2006).

### 2.3.3 Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular

O VEGF, uma glicoproteína homodimérica, é um fator de crescimento específico para as células endoteliais que foi isolado apenas em 1983 (SENGER, 1983). É um regulador essencial da vasculogênese e angiogênese, assim como um potente indutor da permeabilidade vascular, uma vez que sua ação é,

aproximadamente, 50 mil vezes mais potente que a histamina (SENGER, 1990). O VEGF é produzido por células tumorais, macrófagos e linfócitos; já no globo ocular, a sua produção ocorre pelas células do EPR, células endoteliais dos capilares retinianos, pericitos e células de Muller (ADAMIS et al., 1993; PIERCE et al., 1995). No tecido retiniano, a produção do VEGF é intensificada pela hipóxia, sendo o diabetes um exemplo clássico, já que a isquemia retiniana originada pela redução do aporte de oxigênio eleva a quantidade do VEGF intravítreo (AIELLO et al., 1994).

A família VEGF consiste em VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PIGF). O PIGF foi originalmente clonado do DNA da placenta humana e apresenta uma sequência de aminoácido 46% idêntica ao VEGF (MAGLIONE, et al., 1991). Acredita-se que esse fator module a angiogênese induzida pelo VEGF (CAO et al., 1996). Já o VEGF-B é um fator muito importante na angiogênese, uma vez que age na degradação da matriz extracelular, e na adesão e migração celular. O VEGF-C e D são os mais parecidos entre a família VEGF, uma vez que são idênticos em 61% da sua constituição – ambos apresentam uma ação mitogênica no endotélio de células endotélias. Entretanto, classicamente, são conhecidos pelo seu papel como fator de crescimento linfangiogênico (VEIKKOLA; ALITALO, 1999).

Existem três receptores tirosina quinase nos quais agem a família VEGF: VEGFR 1, 2 e 3. O VEGFR 1 tem efeitos angiogênicos positivos e negativos, nos quais agem o VEGF A e B. O VEGFR 2 é mediador primário da mitogênese, angiogênese e fator de permeabilidade vascular gerados, principalmente, pelo VEGF-A – apesar de todos membros da família VEGF agirem nesse receptor. Já o VEGFR 3 medeia os efeitos angiogênicos nos vasos linfáticos, nos quais se ligam o VEGF C e D (FERRARA; GERBER; LeCOUTER, 2003; KARKKAINEN; MAKINEN; ALITALO, 2002).

O VEGF, como é classicamente conhecido, refere-se ao VEGF-A, que apresenta um papel vital na angiogênese. Existem, pelo menos, quatro isoformas em seres humanos: VEGF-A121, 165, 189 e 206 – embora, com menor frequência, outras variantes venham sido relatadas: VEGF 145, 148, 162, 165b e 183 (BHISITKUL, 2006). O número que acompanha a sigla refere-se à quantidade de aminoácidos contidos nas proteínas do VEGF. O VEGF-A165 é a isoforma predominante encontrada no olho, além de ser a mais associada com modelos pré-

clínicos de angiogênese (SATTI et al., 2009; AMERI et al., 2007). O VEGF estimula a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, além da divisão e migração de células endoteliais e fibroblastos que produzem um sítio propício para a formação de novos vasos. Outra característica importante do VEGF-A165 é sua ação pró-inflamatória.

A neovascularização induzida pela isquemia era classicamente considerada de natureza não-inflamatória. Contudo, já foi demonstrado que o VEGF 165 é responsável pelo influxo de células inflamatórias. O VEGF funciona como uma citocina pró-inflamatória com ação tanto nos leucócitos, quanto nas células endoteliais e, durante o processo de neovascularização patológica, o VEGF 165 leva ao recrutamento de leucócitos nos sítios da neovascularização patológica (ISHIDA et al., 2003).

#### 2.4 Modelos de Neovascularização Retiniana

Pelo fato das doenças vasculares da retina serem uma das principais causas de cegueira, muitos estudos têm sido feitos a respeito delas. Com o objetivo de melhor entender e tratar a angiogênese patológica, diversos modelos experimentais de neovascularização ocular foram criados. Os modelos, simulando retinopatias isquêmicas, estendem-se desde injeções intravítreas de látex (SAMPAIO et al., 2010), fibroblasto (TANO; CHANDLER, MACHEMER, 1981) e VEGF (SAATI et al., 2010), até modelos gerados por irritação química, como trauma a vasos retinianos (DEEM; FUTTERMAN; KALINA, 1974), oclusão vascular por fotocoagulação a laser (HAMILTON et al., 1975), implantação de cepas tumorais (FINKELSTEIN et al., 1977), e administração de grandes quantias de oxigênio (PENN; TOLMAN; LOWERY, 1993).

Dentre os modelos experimentais simulando a retinopatia isquêmica, tal como a retinopatia diabética, Tano et al. se destacaram na década de 1980 ao desencadear a neovascularização retiniana em coelhos com injeções intravítreas de

fibroblastos cultivados. Mais recentemente, Sampaio et al. (2010) também demonstraram a angiogênese patológica na retina após a injeção de latex na cavidade vítrea dos coelhos. Entretanto, não é plausível excluir a possibilidade de uma neovascularização secundária a uma resposta inflamatória nesses modelos experimentais. Já os modelos com implante de VEGF em coelhos demonstram que a barreira hemato-retiniana é quebrada logo nos três primeiros dias e, com 21 dias, é detectado a neovascularização retiniana (OZAKI et al., 1997). Okamoto et al. (1997) demonstraram a neovascularização intraretiniana e sub-retiniana com um promotor da rodopsina bovina para expressar um fotorreceptor específico do VEGF humano em ratos transgênicos, o que origina uma neovascularização focal e limitada.

Tolentino et al. (2002) descrevem um modelo de retinopatia diabética, no qual injeções de VEGF foram suficientes para produzir neovascularização pré-retiniana em primatas não humanos. Este modelo demonstra que o VEGF, sozinho, pode produzir características tanto da retinopatia diabética proliferativa, quanto da forma não proliferativa. A maioria das alterações vasculares foram associadas à hiperplasia das células endoteliais. Os achados incluíram áreas de não perfusão vascular, tortuosidade e dilatação dos vasos retinianos – além da formação de tecido neovascular epiretiniano. Tolentino et al. (1996) também demonstraram que a aplicação de VEGF na cavidade vítrea de primatas não humanos é suficiente para produzir neovascularização de íris e glaucoma neovascular.

Diversos modelos experimentais em camundongos, ratos, gatos e cachorros foram criados a partir da década de 1950 para melhor estudar e entender a retinopatia da prematuridade (ROP), que é uma doença originada pela retinopatia isquêmica. O animal recém-nascido é exposto a uma alta tensão de oxigênio, o que irá inibir o desenvolvimento vascular retiniano periférico, além de ocluir os capilares já formados. Quando este mesmo animal é exposto à concentração de oxigênio do ar atmosférico, a hipóxia retiniana estimula a produção exacerbada do VEGF que, por sua vez, estimula a neovascularização retiniana e, no estágio final da doença, é possível observar o descolamento total de retina (PENN et al., 1993; STAHI et al., 2010).

Os modelos experimentais de neovascularização ocular por oclusões venosas são descritos, classicamente, pela fotocoagulação à laser das veias

retinianas com o intuito de propiciar a oclusão desses vasos. Alguns autores descrevem um modelo com alta taxa de neovascularização retiniana. Contudo, a formação dos neovasos pode demorar até três meses após a aplicação do laser (HAMILTON et. al, 1975). Já Pournaras et al. (1990) descrevem um modelo de neovascularização em porcos após três semanas da oclusão venosa. Entretanto, os neovasos aparecem em apenas 59% dos animais.

A neovascularização de coróide tem sido muito estudada devido a sua grande importância na fisiopatogenia da DMRI exsudativa. Os modelos desta neovascularização se baseiam no implante sub-retiniano de VEGF (QUI et al., 2006) ou na terapia gênica (JULIEN et al., 2008).

O modelo experimental de neovascularização ideal seria de baixo custo, com um animal pequeno, que apresentasse uma neovascularização secundária a um estímulo como o VEGF, já que este fator de crescimento apresenta um papel chave na angiogênese patológica ocular. Além disso, deve ser um modelo confiável, eficiente, sustentável e reprodutível.

## 2.5 Doenças Vasculares da Retina

Doenças vasculares que afetam a retina são responsáveis pela maioria das causas de baixa acuidade visual. O diabetes *mellitus* é o maior contribuinte para esse grupo de doenças e a principal causa de cegueira em adultos em idade ativa nos Estados Unidos, correspondendo a, pelo menos, 12% dos novos casos de cegueira anual nos EUA, cegando mais de oito mil pessoas anualmente (KLEIN, 1992). A neovascularização da retina é a parte crítica das doenças vasculares de retina, não apenas no diabetes, mas também na retinopatia da prematuridade, oclusões vasculares e degeneração macular relacionada à idade (LEE; WANG; ADAMIS, 1998). Estas patologias apresentam, em comum, o comprometimento de oxigênio no tecido retiniano, o que gera a isquemia retiniana e leva à produção de diversos fatores angiogênicos, especialmente o VEGF, um dos principais responsável da neovascularização. A neovascularização de retina envolve o crescimento de novos capilares que surgem do disco óptico ou da retina, geralmente

das vênulas. Inicialmente, os novos e frágeis capilares deitam-se sobre superfície retiniana, estendendo-se, posteriormente, ao vítreo e formando traves fibrovasculares que se podem contrair, resultando em hemorragia vítrea e, ocasionalmente, no descolamento de retina.

A retinopatia diabética é a principal causa de cegueira em adultos em idade produtiva (KLEIN; KLEIN; MOSS, 1984). É uma microangiopatia com achados histopatológicos típicos que inclui a perda de pericitos, células endoteliais e espessamento da membrana basilar, e apresenta alterações na parede vascular fatores que, combinados, levam à oclusão de capilares e, posteriormente, à isquemia retiniana. Essa hipóxia retiniana induz a produção do VEGF e outros fatores angiogênicos que promovem a formação de neovasos retinianos, ao que se dá o nome de retinopatia diabética proliferativa (RDP), que pode evoluir para hemorragia vítrea, descolamento tracional de retina, neovasos de íris e glaucoma neovascular. Análises da cavidade vítrea dos pacientes com RDP constata níveis elevados do VEGF em comparação aos pacientes diabéticos com a forma não proliferativa (RDNP), o que demonstra a importância do VEGF na neovascularização (AIELLO et al., 1994). Injeções de VEGF induzem, em animais, achados clínicos semelhantes ao da retinopatia diabética, como o aumento da permeabilidade vascular, formação de neovasos de retina, íris e descolamento tracional de retina (OZAKI et al., 1997). Com o advento das terapias inibidoras do VEGF, observa-se grande progresso no tratamento cirúrgico e, principalmente, no tratamento clínico da forma proliferativa da retinopatia diabética, uma vez que essas medicações reduzem o edema retiniano e promovem a regressão dos neovasos (MOHAMED; GILLES,; WONG, 2007; WILLARD; HERMAN, 2012).

A primeira descrição de um quadro fundoscópico de oclusão venosa foi reportado em 1854. No entanto, apenas em 1877 Michel identificou a trombose como causa dessa patologia (WU et al., 2009). Depois da retinopatia diabética, a oclusão venosa é, a doença vascular mais comum da retina. Apesar da patogênese ainda não ser totalmente esclarecida, diversos fatores de riscos têm sido descritos, incluindo idade, arteroesclerose dos vasos retinianos, hipertensão e glaucoma (CUGATI et al., 2006; HAYREH et al., 2001). As oclusões venosas podem manifestar-se com a forma edematosa ou isquêmica, a qual, em 30 a 50% dos olhos, evolui com a neovascularização de retina. Esses neovasos podem se

manifestar na íris e no ângulo da malha trabecular, gerando um quadro devastador: o glaucoma neovascular. Diversos estudos prospectivos e retrospectivos demonstram o benefício da terapia antiangiogênica no tratamento da neovascularização patológica (AVERY, 2006) e na terapia da forma edematosa (PRAGER et al., 2009; HSU et al., 2007).

A degeneração macular relacionada foi, inicialmente, descrita por Otto Haab em 1885. Esta é a principal causa de perda visual em pacientes acima de 50 anos em países desenvolvidos (SEDDON; CHEN, 2004). A fisiopatogenia permanece incerta, mas existe evidências de que a degeneração represente um estado inflamatória crônico. A formação de drusas entre o EPR e a membrana de Bruch pode evoluir para a degeneração macular atrófica ou a exsudativa. Esta última forma apresenta estreita relação com a produção exacerbada do VEGF. Inúmeros estudos multicêntricos demonstram o ganho visual com a aplicação intravítrea de medicamentos anti-VEGF para a DMRI exsudativa (ROSENFELD et al., 2006; WU et al., 2008).

A retinopatia da prematuridade (ROP) é uma doença vasoproliferativa multifatorial que ocorre em recém-nascidos prematuros. Na década de 1950, quando surgiu a epidemia da ROP, estimou-se que ela foi responsável por 30% dos pré-escolares cegos nos EUA (HEATH, 1951). Sabe-se que a fisiopatogenia da retinopatia da prematuridade tem em comum a imaturidade retiniana, períodos de hiperoxia e hipoxia associadas. Estes fatores culminam com o aumento da produção do VEGF que, por sua vez, estimula a neovascularização retiniana. Assim como em outras doenças vasculares retinianas, o tratamento com aplicações intravítreas de anti-VEGF tem se mostrado promissor.

Independentemente da diversidade das doenças vasculares apresentadas, o VEGF desempenha um papel chave nesse processo, tanto que o tratamento com o anti-VEGF vem sendo cada vez mais preconizado (KIMOTO; KUBOTA, 2012). Logo, diversos modelos animais de neovascularização têm sido criados para melhorar o conhecimento e otimizar o tratamento das doenças angiogênese-dependentes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento da Pesquisa

O trabalho experimental está de acordo com os princípios de proteção aos animais de laboratório (publicação número 85-23 do Instituto Nacional de Saúde dos EUA, revisada em 1985). Toda a pesquisa respeitou a resolução da ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) para pesquisa oftalmológica e visual em animais. Este estudo foi aprovado pelo Instituto de proteção dos animais e pelo comitê de pesquisa da Universidade do Sul da Califórnia (IACUC). Foram adotadas as normas para apresentação de documentos científicos da Universidade Federal do Paraná (2002), baseadas na Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

#### 3.2 Animais e Local de Estudo

Doze coelhos pigmentados, machos, pesando entre 2 a 3 kg, foram incluídos na pesquisa, sendo que apenas o olho direito de cada animal foi utilizado para a realização do estudo, que ocorreu entre 02 de julho de 2009 até 10 de janeiro de 2010 no setor de pesquisa experimental do Doheny Eye Institute da Universidade do Sul da Califórnia. Cada animal permaneceu em gaiolas individuais e foram tratados com ração padronizada, água e com acompanhamento veterinário.

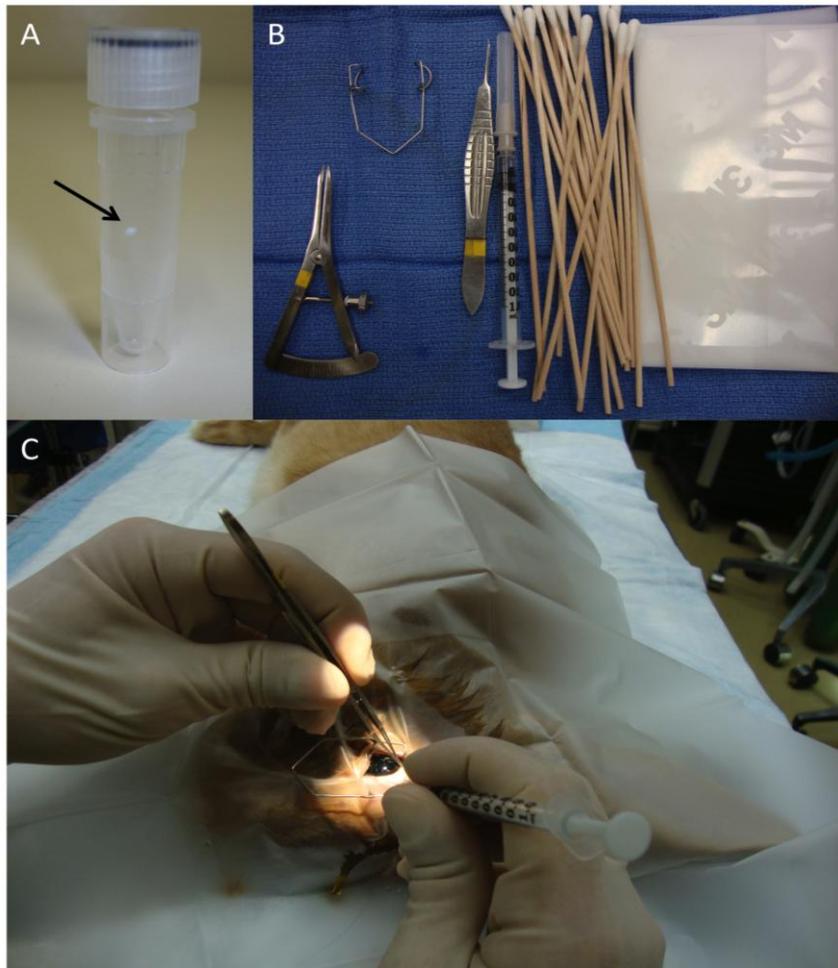
#### 3.3 Grupos em Estudo

Os coelhos foram divididos em três grupos: I, II e III. O primeiro grupo, constituído por três coelhos (n=3), serviu como grupo controle. Cada animal do grupo I recebeu uma injeção intravítrea de 0.1 mL de solução salina balanceada (BSS) no dia zero. Cada animal do grupo II (n=6) recebeu uma injeção intravítrea de 10 µg de VEGF (VEGF165 recombinante humano, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em 0.1mL de BSS no dia zero (Figura 3A). Já no grupo III (n=3), foram injetados 10 µg de VEGF165 intravítreo duas vezes, com intervalo de sete dias entre as aplicações (dia zero e dia 7). O período de acompanhamento foi de 28 dias nos três grupos.

### 3.4 Injeções Intravítreas

Todos os coelhos foram submetidos a anestesia antes das injeções intravítreas com aplicação subcutânea de cloridrato de cetamina (25mg/kg) (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, EUA). A tetracaína tópica (Baush & Lomb Inc, Tampa, FL, EUA) foi aplicada na conjuntiva para anestesia adicional. As pupilas foram dilatadas com colírio tópico de cloridrato de fenilefrina 2.5% (Akorn, Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) e tropicamida 0.5% (Akorn, Inc.). As injeções foram realizadas em condições estéreis, além do uso de duas gotas de iodopovidona 5% (Butler Animal Health Supply, Dublin, OH) antes das aplicações.

O procedimento foi realizado por meio da visualização direta com um microscópio cirúrgico Zeiss (Carl Zeiss Surgical Inc, Jena, Alemanha). Para afastar as pálpebras, foi inserido um espéculo (blefarostato). Para a injeção intravítrea, uma agulha de 30 gauge acoplada numa seringa de 1 mL foi introduzida na cavidade vítrea transconjuntivamente, no quadrante temporal superior a 1.5 mm do limbo (figura 3). No grupo III, a segunda dose de VEGF (10µg diluída em 0.1 mL de BSS) foi aplicada no quadrante nasal superior. Ao final do procedimento, o local da aplicação era comprimido com a ponta do cotonete e, após instilado, pomada antibiótica tópica (Neo-Poly-Bac; bausch@Lomb Inc., Florida, EUA).

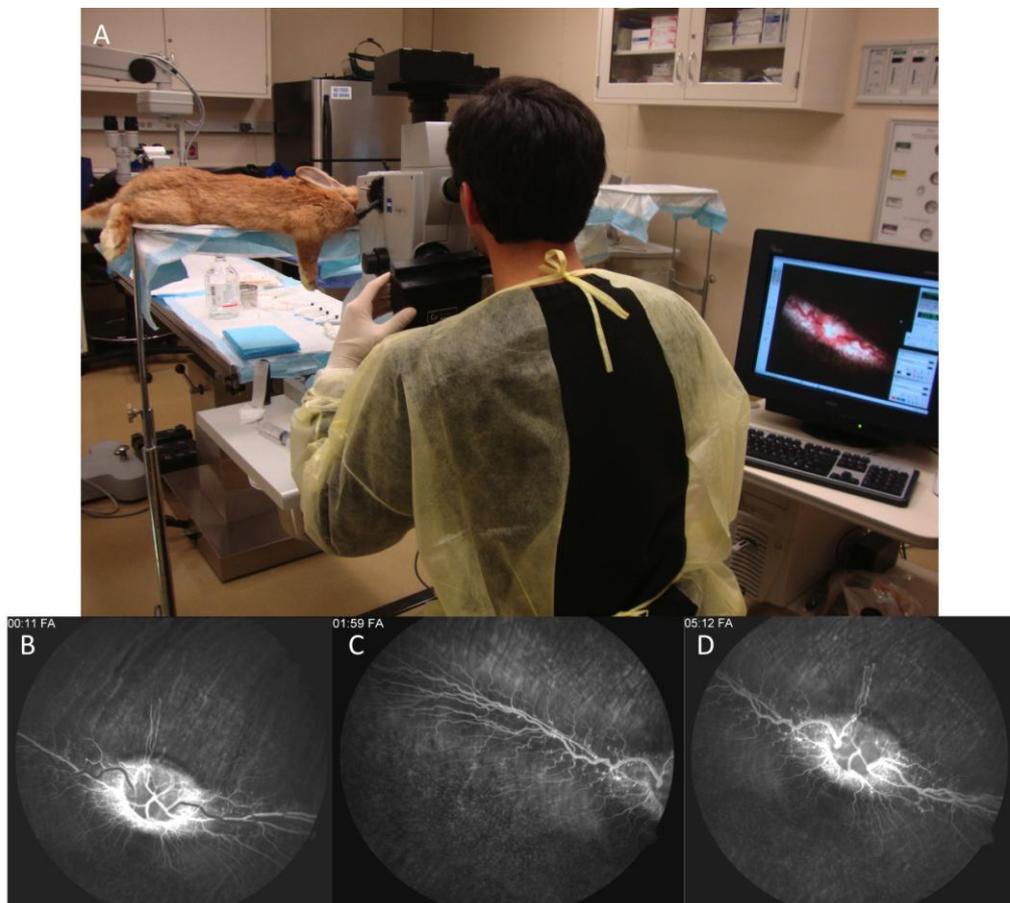


**Figura 3.** Instrumentos e aplicação da injeção intravítrea de VEGF. **A**, Seta indicando o ponto branco (10 $\mu$ g de VEGF condensado aderido na parede do frasco). **B**, Instrumentos: compasso, blefarostato, pinça conjuntival, seringa, cotonetes, campo cirúrgico estéril. **C**, Injeção intravítrea.

### 3.5 Seguimento

Os coelhos foram avaliados pelo microscópico cirúrgico, fotografias coloridas, angiografia fluoresceínica e tomografia de coerência óptica. Antes de cada sessão, os coelhos foram anestesiados e suas pupilas dilatadas, conforme explicado previamente. Após todos os exames iniciais, no dia zero foi realizada a injeção do VEGF ou BSS nos diversos grupos. Nos dias 3, 7, 14 e 28, todos os exames foram repetidos. Os animais do grupo III receberam uma segunda injeção de VEGF no sétimo dia após a realização dos exames.

Em relação ao estudo fotográfico, foi utilizado o retinógrafo digital (modelo FF 350 IR; Carl Zeiss, Jena, Alemanha) para fotografias do fundo de olho, focalizadas em quatro áreas: disco óptico, asa medular temporal, asa medular nasal e inferior da retina. O mesmo retinógrafo foi utilizado para a aquisição das imagens digitais da angiografia (Figura 4). Um acesso venoso na orelha da veia marginal foi obtido para a injeção de 0.2 mL de fluoresceína a 10% (Alcon, Texas, EUA), seguida de infusão em bolo de 1 mL de soro fisiológico 0.9%. Fotografias sequenciais foram tiradas imediatamente após a injeção do contraste até a fase final da angiografia (5 minutos). As fotografias do segmento anterior também foram registradas entre 1 e 5 minutos.

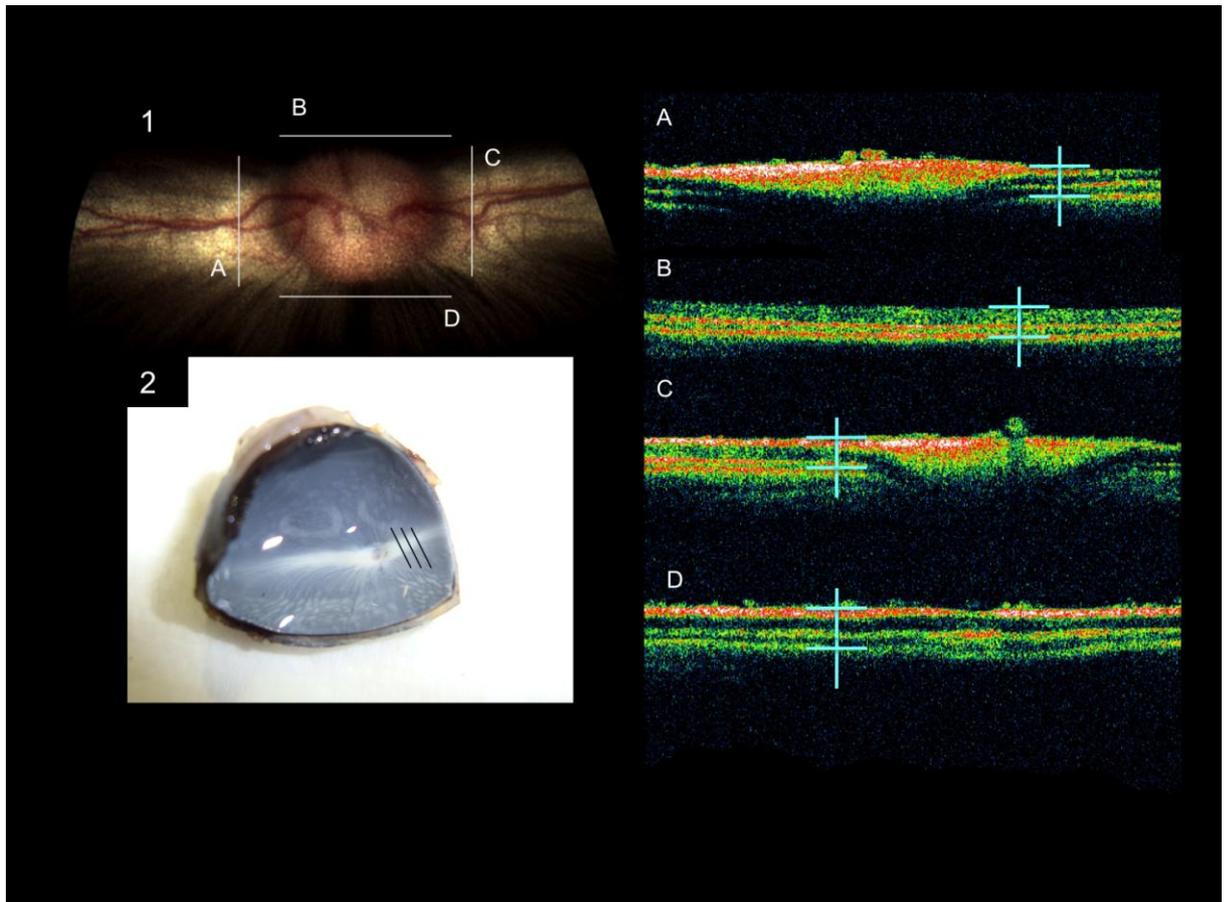


**Figura 4.** Angiografia digital após a aplicação da fluoresceína na orelha do coelho do grupo I durante o exame do dia zero. **A**, Aquisição das imagens digitais. **B**, Fase inicial do angiograma. **C**, Fase intermediária. **D**, Fase tardia da angiografia

A aquisição dos cortes tomográficos pelo OCT (Stratus; versão 4.0; Carl Zeiss Meditec, Inc, California, EUA) permitiu o estudo de cortes radiais de 5 mm próximos

à cabeça do nervo óptico (Figura 5). Com isso, a espessura retiniana foi mensurada nos quatro quadrantes justapapilares. Essas medidas foram repetidas nas mesmas regiões durante os exames subsequentes. Foi aferida a espessura retiniana dos quadrantes justapapilares: temporal, nasal, superior e inferior. Já os cortes histológicos foram realizados na porção da asa medular retiniana justapapilar ao longo da asa medular retiniana (Figura 5).

Ao final do 14<sup>o</sup> dia, após o último exame, um animal de cada grupo foi sacrificado com injeção intracardíaca de 2mL de pentobarbital (Beuthanasia-D; Shering Plough Animal Health, Nebraska, EUA). O restante dos animais foram sacrificados no 28<sup>o</sup> dia. Os olhos foram enucleados e colocados numa solução fixadora de Davison por 24 horas. Depois disso, foram desidratados em álcool por mais 24 horas para, então, serem embebidos em parafina. Os blocos foram obtidos por cortes perpendiculares a asa medial retiniana (Figura 5). Com um micrótomo, inúmeras secções de 5 µm de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina. Depois, foram examinadas num microscópio óptico (magnificação 100x).



**Figura 5.** Cortes tomográficos e histológicos. 1, Fotografia da retina do coelho identificando os cortes tomográficos nos diversos sentidos: **A**, Retina justapapilar da asa medular temporal. **B**, Retina

justapapilar superior. **C**, Retina justapapilar da asa medular nasal. **D**, Retina justapapilar inferior. **2**, Olho enucleado com as faixas pretas delimitando o local dos cortes histológicos

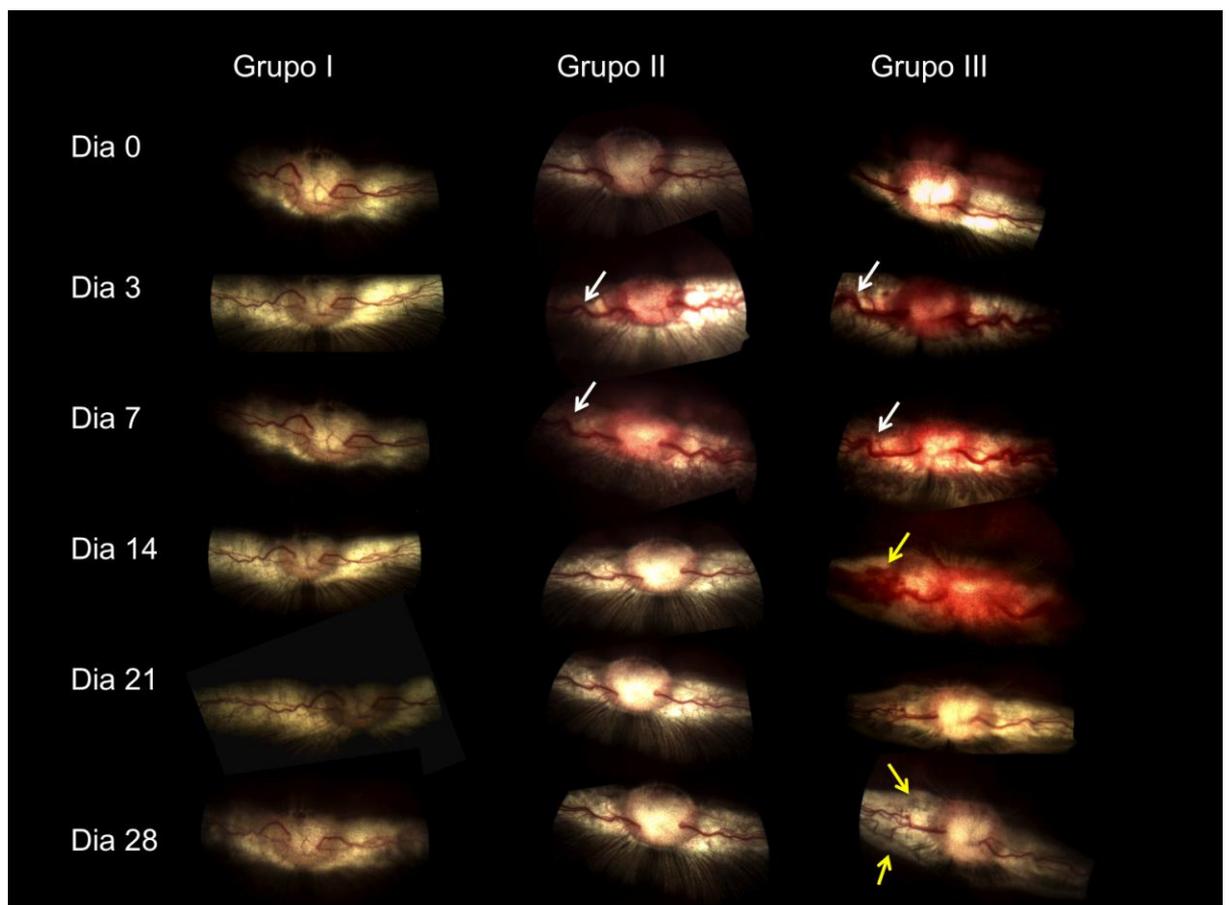
### 3.6 Análise Estatística

Em relação à análise estatística para mensurar a média da espessura retiniana em cada área e comparar os diferentes grupos nos diversos tempos do acompanhamento foi empregado a análise de variância (ANOVA) com  $p < 0,05$  considerado significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Retinografia

As fotos coloridas do fundo de olho do grupo I mantiveram-se inalteradas durante todo período de acompanhamento. No grupo II, coelhos que receberam uma injeção de VEGF165 apresentaram aumento da dilatação e tortuosidade dos vasos retinianos no dia 3. Essas mudanças progrediram até o dia 7, quando regrediram até o fim do seguimento. No grupo III, coelhos que receberam uma injeção de VEGF165 no dia 0 e outra no dia 7 também demonstraram aumento da dilatação e tortuosidade dos vasos retinianos já no dia 3. Entretanto, esse quadro progrediu até o dia 14, quando também foram detectadas hemorragias retinianas parapapilares. Ao final do acompanhamento do grupo III, percebeu-se uma contração da asa medular nasal e temporal (Figura 6).

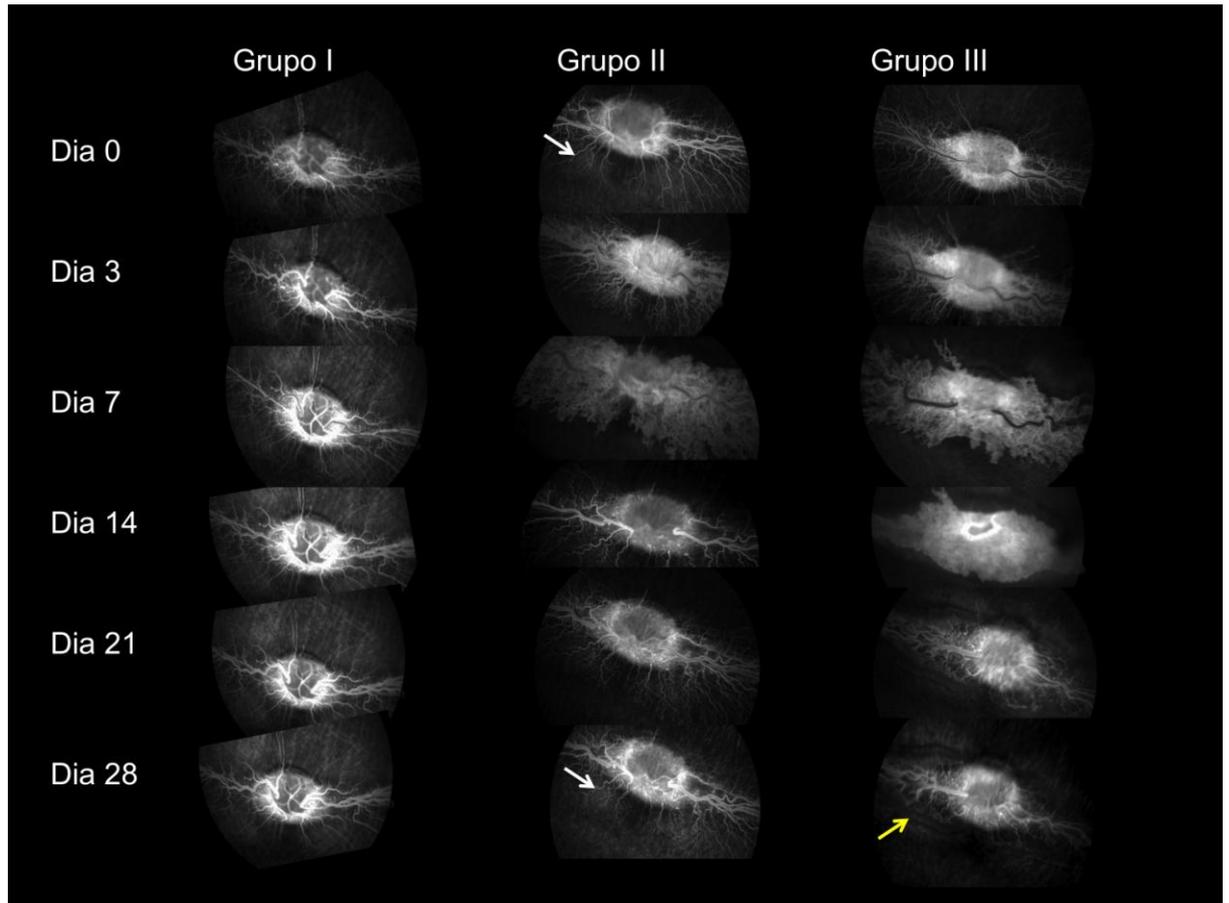


**Figura 6.** Imagens coloridas do fundo de olho dos grupos I, II e III. As imagens em cada coluna mostram as alterações fundoscópicas de um coelho representante de cada grupo em relação aos diferentes períodos do acompanhamento. Achados semelhantes foram observados em animais

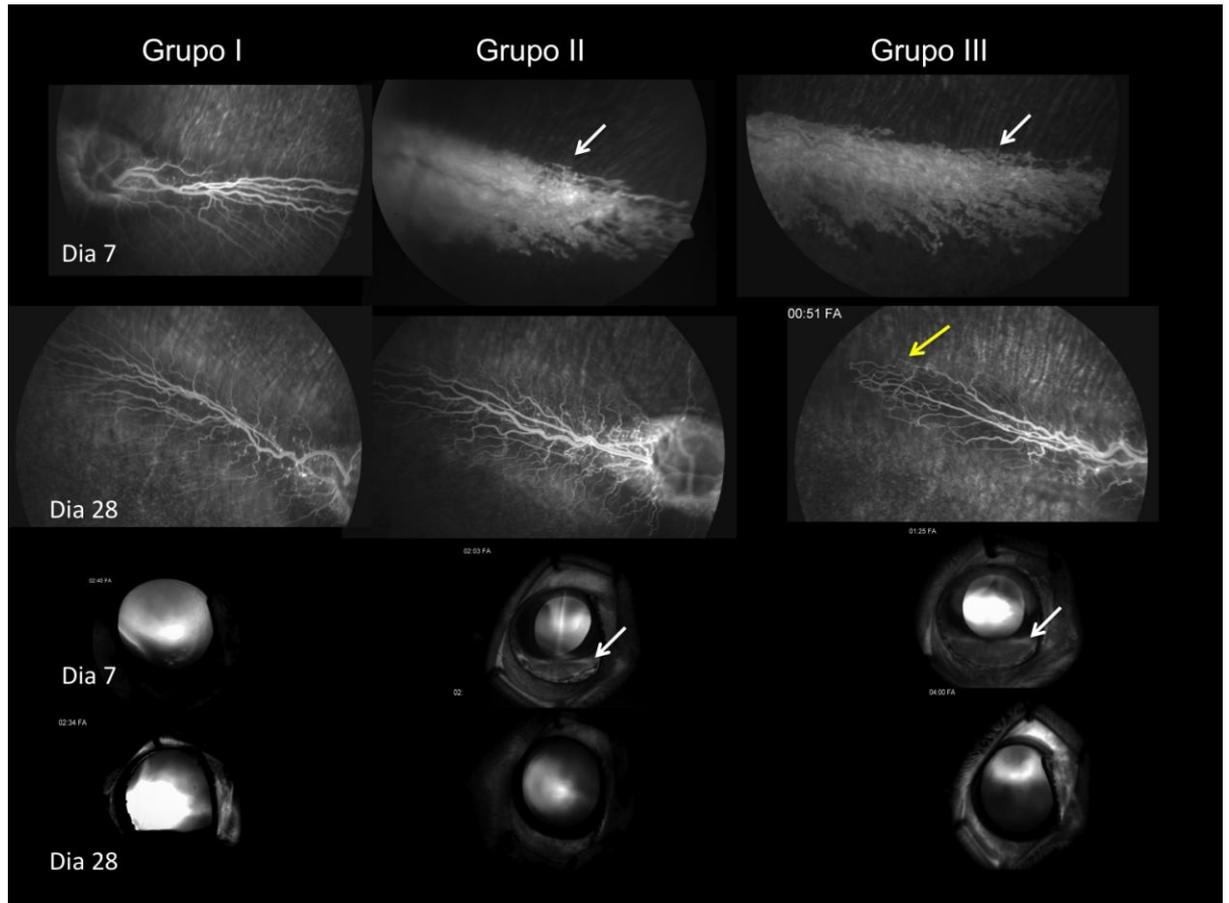
dentro de cada grupo. Grupo I, Injeção de BSS. Grupo II, Uma injeção de VEGF no dia zero. Grupo III, Duas injeções de VEGF: dia zero e sete. As setas brancas marcam a dilatação e aumento da tortuosidade dos vasos. Já as setas amarelas evidenciam, no grupo III, a hemorragia retiniana no dia 14, além das dobras na camada de fibras de mielina ao 28º dia.

## 4.2 Angiografia Fluorescente

A AF não detectou alterações durante o tempo de acompanhamento nos animais do grupo de controle. Tanto no grupo II, quanto no III verificou-se um vazamento dos vasos retinianos (Figura 7) e irianos (Figura 8) durante as primeiras 72 horas após a injeção do VEGF165. No grupo II, o máximo da atividade angiogênica foi alcançada no dia 7 com a formação de um tecido neovascular. Após o sétimo dia, esse tecido regrediu e desapareceu ao fim do período de acompanhamento, apesar da tortuosidade capilar ter persistido. Por outro lado, a angiografia demonstrou no grupo III o pico de alterações neovasculares e de vazamento retiniano no décimo quarto dia e, no vigésimo oitavo dia, foi documentada uma área de má perfusão inferior à papila (Figura 7) e isquemia retiniana periférica (Figura 8).



**Figura 7.** Fase inicial da angiografia fluoresceínica nos três grupos. Cada coluna representa um animal de cada grupo num determinado dia do acompanhamento. Achados semelhantes foram observados em animais dentro de cada grupo. O ápice da formação neovascular no grupo II ocorreu no dia 7, enquanto este pico ocorre no dia 14 no grupo III. No 28º dia do grupo II, a tortuosidade capilar ainda permanece (seta branca compara a tortuosidade no primeiro e último dia). Já no grupo III, desde o 21º dia, existe uma má perfusão justapapilar, especialmente na região inferior que permanece até o 28º dia (seta maior).

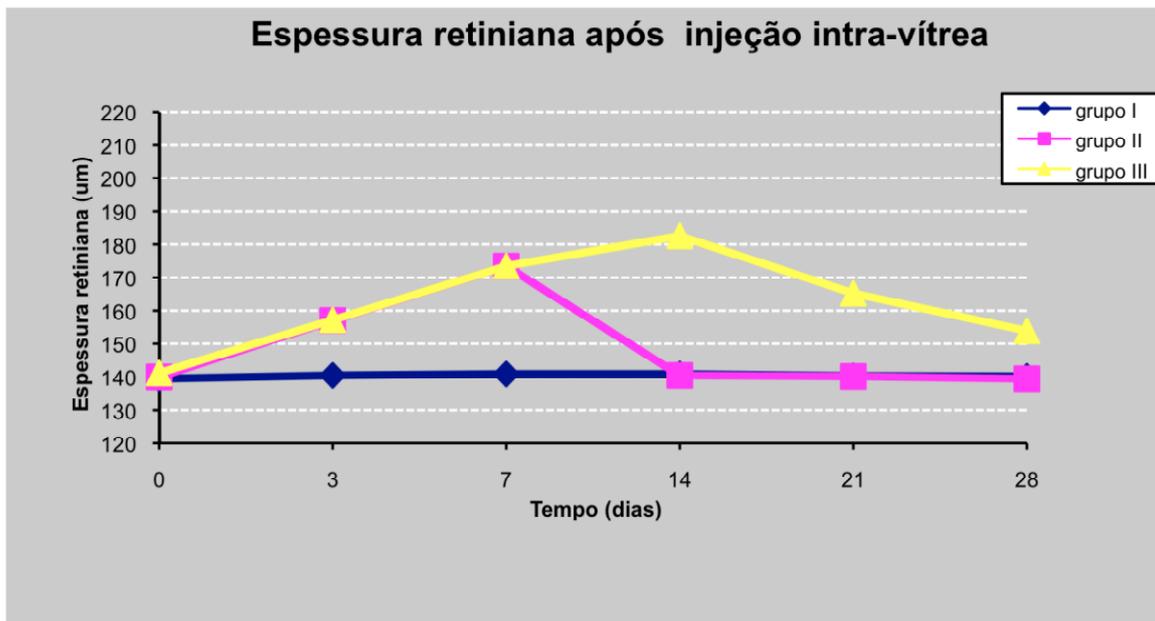


**Figura 8.** Angiografia da asa medular, periferia retiniana e do segmento anterior. No 7º dia, ocorre a neovascularização e a exsudação na retina, além de importante vazamento dos vasos irianos dos grupos submetidos à injeção do VEGF (setas brancas). Já no 28º dia, verifica-se uma regressão desses sinais. No entanto, na asa medular do grupo III, nota-se *shunts* arteriovenosos, veno-venosos e uma regressão da arquitetura vascular (setas amarelas).

#### 4.3 Tomografia de Coerência Óptica

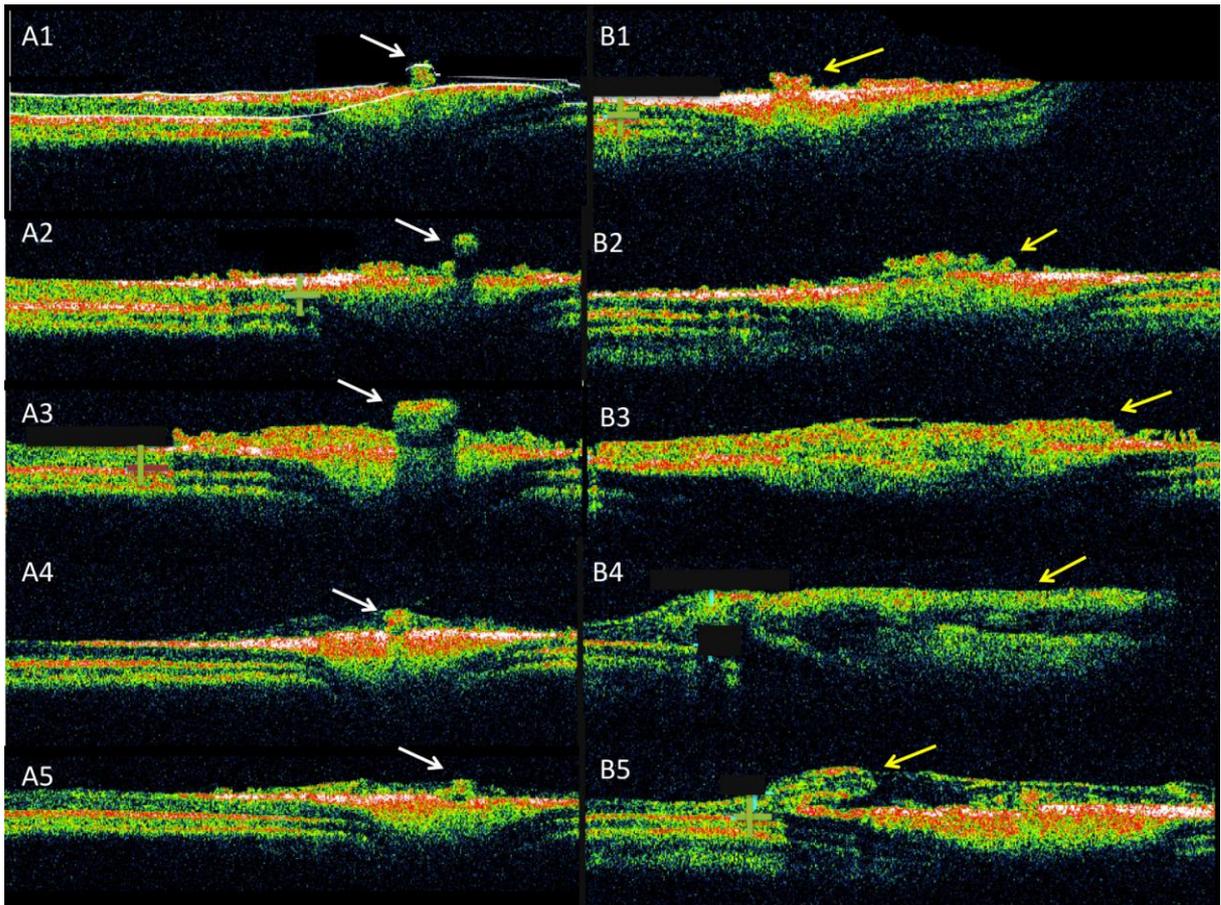
O OCT não detectou mudanças na média da espessura retiniana (140.42  $\mu\text{m}$ ) ao redor da cabeça do disco óptico durante o período de acompanhamento do grupo I. Entretanto, no sétimo dia, um aumento significativo na média da espessura retiniana foi presente no grupo II e III ( $p < 0.001$  para ambos) quando comparados com o grupo controle. Após o dia 7, a média da espessura retiniana no grupo II decresceu aos níveis iniciais. Por outro lado, o máximo da média da espessura retiniana no grupo III (182.58  $\mu\text{m}$ ) foi visto no décimo quarto dia de seguimento, passando a diminuir após este período. Não foi encontrado

significância estatística ( $p=1.0$ ) entre os grupos II e III no dia 7, mas a diferença da medida da espessura retiniana entre os grupos II e III no décimo quarto dia foi estatisticamente positiva ( $173.50 \mu\text{m}$  e  $182.58 \mu\text{m}$ , respectivamente) ( $p<0.001$ ) (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Relação entre os três grupos com a espessura retiniana e o tempo de segmento. Grupo I, a espessura retiniana se manteve constante. Grupo II, aumento da espessura até o sétimo dia. Já no grupo III, o ápice ocorreu no 14º dia regredindo ao longo dos dias.

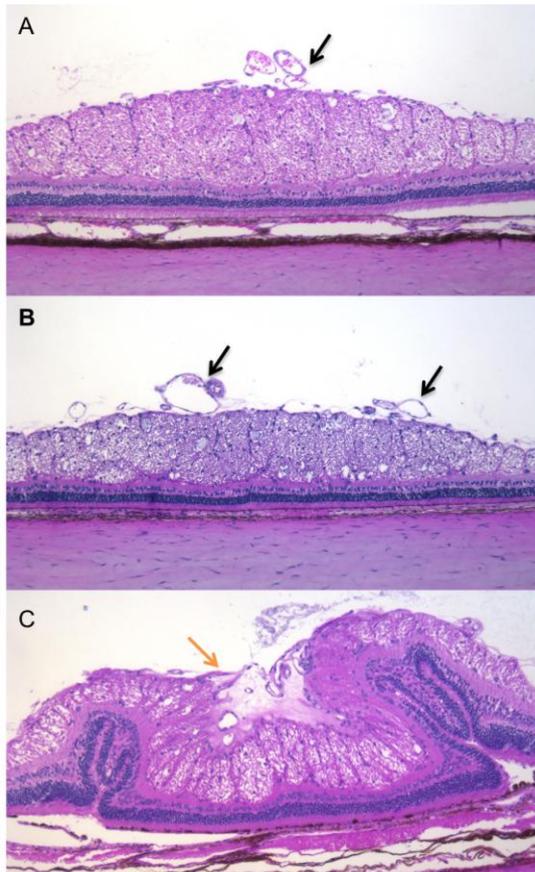
Os achados morfológicos não variaram durante o monitoramento do grupo controle. Entretanto, no grupo II foi verificada uma progressão no diâmetro dos vasos retinianos e a formação de um tecido epiretiniano até o sétimo dia que, no decorrer do acompanhamento, regrediu juntamente com a espessura dos vasos. Já no grupo III, o tecido neovascular evoluiu para o descolamento de retina tracional (Figura 9).



**Figura 9.** Achados tomográficos comparando os grupos II (**A**) e III (**B**) nos dias 0, 3, 7, 14 e 28, respectivamente 1, 2, 3, 4 e 5. **A**, Seta branca evidencia o padrão o aumento do diâmetro dos vasos até o dia 7 (A3) e sua regressão no decorrer do período de acompanhamento. **B**, Seta amarela demonstra a evolução dos vasos retinianos do dia 0 (B1) até a formação do DR no dia 28 (B5).

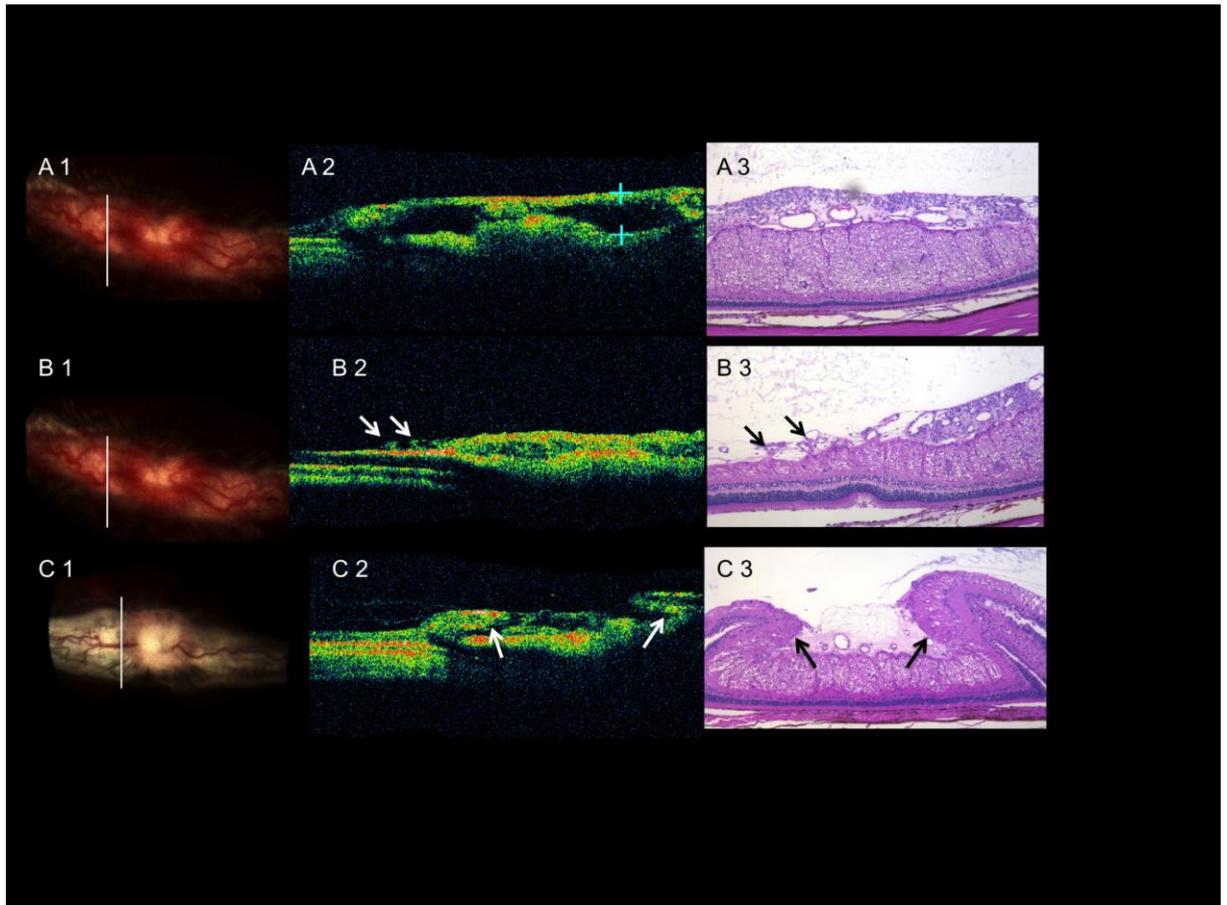
#### 4.4 Histopatologia

Os achados histopatológicos revelaram importantes diferenças entre os grupos II e III em relação ao grupo controle. Um aumento do número de vasos retinianos foi detectado no grupo II mesmo ao final do acompanhamento. Já o grupo III, no dia 28, desenvolveu um tecido neovascular associado com descolamento tracional de retina (Figura 10).



**Figura 10.** Cortes histológicas (magnificação 100X) com impregnação de hematoxilina e eosina dos três grupos no 28º dia. **A**, Corte histológico da retina justapapilar evidenciando a veia e artéria sobre a superfície retiniana do grupo I . **B**, Histologia do grupo II, no qual foram encontrados vasos mais calibrosos e numerosos (setas). **C**, Presença de um descolamento de retina tracional no qual é possível verificar o tecido neovascular tracionando a retina.

Os achados tomográficos e histopatológicos foram bem similares. No décimo quarto dia, os coelhos do grupo III demonstraram, pelo OCT, áreas de trações vítreo-retinianas próximas ao disco óptico (Figura 11). Os mesmos animais do grupo III foram seguidos até o dia 28, quando demonstraram um descolamento de retina tracional junto à asa medular tanto pelo OCT, quanto pelo estudo histopatológico (Figura 11).



**Figura 11.** Correlação entre retinografia, histologia e tomografia óptica do grupo III no 14º dia (A, B) e no 28º dia (C). **A1**, Retinografia demonstrando o local do corte tomográfico (linha branca). **A2**, Corte tomográfico e **A3**, Corte histológico delimitando o tecido neovascular sobre a retina. **B1**, Retinografia evidenciando o sítio do corte tomográfico. **B2** e **B3**, Pontos de tração vítreo-retiniana detectados tanto no OCT, quanto na histologia (setas). **C1**, Fotografia do fundo de olho. **C2** e **C3**, Descolamento de retina ao 28º dia verificado tanto no corte tomográfico quanto no histológico (setas demarcam o contorno da retina que se dobrou sobre a camada de fibras nervosas).

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a injeção de 10 µg de VEGF165 na cavidade vítrea dos olhos de coelhos causa alterações retinianas como o extravazamento da fluoresceína dos vasos (aumento da permeabilidade vascular) e neovascularização. Além disso, uma segunda aplicação do VEGF produz hemorragias retinianas, áreas de má perfusão periférica, membranas epirretinianas fibrovasculares, e descolamento tracional de retina, achados que são notavelmente semelhantes aos observados na retinopatia diabética proliferativa em humanos (MOHAMED; GILLIES; WONG, 2007). Os exames oftalmológicos durante o tempo de acompanhamento dos coelhos no grupo controle não demonstraram alterações em relação aos exames iniciais, indicando que as injeções intravítreas de BSS não quebram a barreira hemato-retiniana ou causam alguma reação inflamatória.

Nossos resultados são baseados nos efeitos de uma ou duas injeções de VEGF. Foi utilizado o VEGF165 porque é o fator mais importante relacionado à neovascularização patológica ocular em diversas doenças como a retinopatia diabética, DMRI, oclusões vasculares retinianas e ROP (WU et al., 2008). A dose de 10 µg foi optada já que outros autores demonstraram que 7.42 +/- 0.54 µg/ml de VEGF na cavidade vítrea foi suficiente para o surgimento da neovascularização de retina (AIKACEM et al., 2000).

Estudo de Ozaki et al. (1997) indica que grandes quantidades de VEGF implantada na cavidade vítrea induzem a quebra da barreira hemato-retiniana antes mesmo de três dias. Os autores também especulam que o VEGF promova um vazamento dos vasos retinianos pelo aumento da permeabilidade das *tight junctions* interendoteliais e por induzir transporte vesicular entre as células endoteliais dos vasos retinianos. Esses pesquisadores demonstram que a neovascularização retiniana ocorreu após a quebra da barreira hemato-retiniana e antes do desenvolvimento do descolamento de retina. Assim como nesses relatos prévios, nossos achados sugerem que, inicialmente, ocorre o extravazamento da fluoresceína dos vasos retinianos e, posteriormente, a neovascularização. Contudo, após a segunda aplicação de VEGF, foi detectado o descolamento tracional de retina ao redor do disco óptico no final do período de monitoramento (28 dias).

Pierce et al. (1995) sugeriu que a expressão do VEGF na retina tem um papel central no desenvolvimento da neovascularização ocular induzido pela isquemia

retiniana. Esses novos vasos surgem após cinco dias de hipóxia. Esses autores comprovaram que o VEGF é regulado pela hipóxia e fortemente correlacionado com a expressão de VEGF e neovascularização retiniana. Para demonstrar a neovascularização intraretiniana e sub-retiniana, Okamoto et al. (1997) utilizaram um promotor da rodopsina bovina para determinar a expressão específica do fotorreceptor humano do VEGF em ratos transgênicos. Entretanto, essa neovascularização é mais focal e limitada do que aquela percebida na retinopatia isquêmica.

Modelos animais anteriores têm demonstrado uma neovascularização retiniana que pode não ser o melhor padrão para testar drogas terapêuticas para a neovascularização ocular patológica. Tano et al. (1981) relatam injeções intravítreas de fibroblastos homólogos em coelhos para o surgimento da neovascularização retiniana em 72% dos animais. Contudo, essa NV foi acompanhada de descolamento de retina, e a inflamação apresenta um importante papel para a gênese desse processo. Sampaio et al. (2010) descrevem um modelo animal de NV no qual foi utilizado a injeção de uma fração purificada de latex natural na cavidade vítrea de coelhos. Entretanto, não exclui a possibilidade de que a neovascularização foi uma resposta inflamatória ao latex, similar a um corpo estranho.

Alguns relatos descrevem a implantação de células cancerígenas a fim de criar a neovascularização. Todavia, esses novos vasos podem demorar até 100 dias para se desenvolverem (FINKELSTEIN et al., 1977). Outros descrevem a angiogênese causada por irritação química ou trauma em vasos de ratos (DEEM; FUTTERMAN; KALINA, 1974) ou oclusões venosas induzidas por fotocoagulação a laser que geram a neovascularização retiniana após três meses (HAMILTON et al., 1975). Esses modelos animais requerem um longo tempo para o desenvolvimento da neovascularização e podem envolver um caminho diferente da angiogênese patológica no olho humano. Pournaras et al. (1990) descreveram um modelo suíno de neovascularização retiniana após três semanas da oclusão de ramo venoso. Entretanto, esses novos vasos surgiram apenas em 50% dos animais. Já os modelos animais que visam reproduzir a retinopatia da prematuridade tendem a gerar o VEGF pela hipóxia retiniana (STAHI et al., 2010).

Em alguns modelos animais, é utilizado um sistema de liberação lenta do VEGF. Neles, o VEGF é adicionado a um polímero formando uma pastilha de VEGF

que foi cirurgicamente implantado acima do nervo óptico – e a neovascularização se desenvolveu geralmente após duas semanas (AIKACEM et al., 2000; OZAKI et al., 1997). A desvantagem da técnica de implante da pastilha é a necessidade da abordagem cirúrgica, uma vez que se faz imperativa uma esclerotomia para a passagem do forceps com a pastilha de VEGF e, posteriormente, sutura da esclerotomia com vicryl 8-0, o qual pode aumentar a reação inflamatória. Wong et al. (2001) descreveram um modelo animal adicionando tanto o VEGF, quanto o bFGF, para a formação da pastilha, o que desencadeou o descolamento de retina total já após a segunda semana. Entretanto, utilizando a pastilha apenas com VEGF ou apenas bFGF, a NV não foi obtida. No nosso estudo, o VEGF foi injetado na cavidade vítrea, o que resultou num intenso extravazamento vascular após três dias e neovascularização após sete dias. Com duas aplicações, o descolamento de retina tracional se desenvolveu no fim do período de acompanhamento, provavelmente resultante da tração do tecido neovascular retiniano. Este achado também foi visto em outros modelos utilizando o VEGF (AMERI et al, 2007), latex (SAMPAIO et al, 2010) e fibroblastos (TANO; CHANDLER; MACHEMER, 1981).

Acreditamos que, no modelo animal mais próximo do ideal, a neovascularização se desenvolveria rapidamente e seria consequência do mesmo estímulo da neovascularização ocular: o VEGF. Essas duas características marcantes são encontradas no nosso modelo animal. Optamos pelo o VEGF injetado na cavidade vítrea para evitar o procedimento cirúrgico de implantá-lo com a pastilha de VEGF. Inúmeras pesquisas demonstram o VEGF como o responsável por diversas patologias oculares envolvendo a neovascularização.

No passado recente, diversas terapêuticas contra o VEGF foram testadas e, hoje, são comercialmente disponíveis para o tratamento intravítreo (bevacizumab - Avastin® - e - ranibizumab - Lucentis®; Genentech, Inc, San Francisco, USA). As doenças vasculares da retina estão entre as principais causas de cegueira no mundo. Entretanto, estudos multicêntricos como o MARINA e ANCHOR demonstraram o valor da terapia anti-VEGF para o tratamento da DMRI exsudativa; já trabalhos como o BRAVO e CRUISE demonstram o benefício com a terapia antiangiogênica para o edema macular após oclusão venosa na retina, além de inúmeros artigos que comprovam o valor dessa terapia para a retinopatia diabética, ROP e glaucoma neovascular. (LUCENA, 2008).

Apesar da grande evolução da oftalmologia com o advento da terapia antiangiogênica, muitas perguntas precisam ser respondidas sobre os atuais medicamentos e, principalmente, sobre as novas drogas que surgirão, como o tempo de duração, toxicidade, eficácia e dose ideal. Assim, acreditamos que o modelo bem detalhado com fotografia, tomografia e histopatologia da neovascularização ocular, tendo o VEGF como indutor, poderá ajudar a testar as futuras terapias intravítreas. Além disso, como o extravazamento dos vasos retinianos pode ser detectado já no terceiro dia, acreditamos que, talvez, este dia seja o melhor momento para testar novas drogas que possam prevenir e reverter esse processo.

Pouco se conhece sobre o papel do VEGF para manter a arquitetura vascular ocular do adulto. Baffer et al. (2006) demonstraram que o VEGF é importante para manter a vascularização no sistema respiratório de camundongos e ratos. Entretanto, Ozaki et al. (2000) verificaram que em ratos adultos não existe a dependência do VEGF para manter a vasculatura retiniana fisiológica. Adamis et al (2005) sugerem que a retirada do VEGF pode levar a regressão dos vasos recém formados, mas não dos mais estabelecidos.

No presente estudo, verificamos uma redução da vascularização periférica associadas com anastomose capilar após duas injeções de VEGF ao final do período de acompanhamento. Esta observação sugere que os vasos normais possam se tornar dependentes do VEGF quando subitamente expostos a altas concentrações de VEGF. Certa quantidade de VEGF parece ser necessária para manter os novos vasos assim como os vasos normais sensibilizados (AMERI et al., 2007). Acreditamos que, em nosso experimento, após o VEGF ter sido eliminado da cavidade vítrea do animal, os capilares em desenvolvimento não conseguiram manter suas estruturas e os vasos periféricos também podem ter sido afetados. Este achado pode tentar explicar porque pacientes diabéticos e com oclusão da veia central, ao receberem uma injeção de antiangiogênico que ira reduzir drasticamente os níveis de VEGF na cavidade vítrea, podem evoluir com a isquemia macular (SABET-PEYMAN et al., 2009; SHIMURA; YASUDA, 2010). Entretanto, os achados do nosso estudo se limitam a estudar uma arquitetura vascular do coelho (retina merangiótica), na qual os vasos estão na superfície da retina e não intra-retinianos como em humanos.

Outra observação importante no nosso estudo foi a formação de anastomoses capilares periféricas, provavelmente relacionadas à hipóxia retiniana, similares às vistas em olhos humanos após condições isquêmicas. Estes achados, provavelmente, não foram observados nos estudos com sistema de liberação lenta do VEGF devido à baixa biodegradabilidade da droga. Em estudos prévios, Tolentino et al. (2002) demonstraram que a injeção do VEGF em primatas foi associada à não perfusão capilar e esse processo foi secundário a hiperplasia e hipertrofia das células endoteliais. Todavia, esses trabalhos não relatam anastomoses entre os capilares.

Embora as medidas bioquímicas para mensurar os níveis do VEGF encontrado no vítreo não tenham sido aferidas, com uma injeção de VEGF o extravazamento vascular não foi detectado após o sétimo dia. Esta constatação sugere que a concentração do VEGF no vítreo após o dia 7 é baixa, certamente abaixo do nível necessário para ser patológica. Com duas injeções; entretanto, o vazamento foi detectado até o décimo quarto dia. Assim, hipotetizamos que esse modelo animal possa ser mantido com injeções de VEGF, especialmente com doses abaixo que 10  $\mu$ g. Esta dose deve ser mais do que suficiente para alcançar e manter a neovascularização retiniana, uma vez que um extravazamento marcante é presente mesmo após uma aplicação intravítrea. Outro dado que comprova a eficácia da dose é a observação do ingurgitamento e tortuosidade também nos capilares irianos além do intenso extravazamento na câmara anterior oriunda desses vasos que, algumas vezes, dificultou o foco retiniano nas fases tardias do angiograma.

Os achados histopatológicos dos olhos enucleados no nosso estudo se assemelham muito com o resultado tomográfico *in vivo* (Figura 11). O OCT evidenciou o espessamento dos vasos retinianos após a injeção de VEGF no grupo II e a formação do tecido neovascular epiretiniano juntamente com áreas de trações vitreo-retinianas que, posteriormente, originaram o descolamento tracional de retina ao redor do disco óptico no grupo III, sendo todos esses achados comprovados com o estudo histopatológico. Devido à tecnologia relativamente recente da tomografia de coerência óptica, a grande maioria dos modelos experimentais não teve acesso a este importante exame. Talvez, uma importante contribuição desse modelo animal foi a introdução e a documentação desta técnica de exame que, teoricamente, pode proporcionar cortes histológicos *in vivo*.

Dentre as limitações do nosso estudo, verifica-se a utilização da NV ser induzida apenas pelo VEGF165. Apesar de ser o fator mais importante, não é o único responsável por esse processo. Além disso, existe o custo do VEGF que, quando comparado a outros modelos de NV como injeção de latex e fotocoagulação a laser, é mais oneroso.

Talvez, o animal mais comum de estudo da NV retiniana seja o coelho, embora existam inúmeros estudos com camundongos, ratos, porcos e até primatas. Nos estudos de retina, os coelhos são úteis porque desenvolvem neovasos e seu tamanho permite injeções intravítreas e monitoramento por equipamentos fotográficos e tomográficos. O baixo custo em comparação aos primatas e porcos é uma importante vantagem adicional, além da facilidade no manuseio e manutenção do animal. A retina do coelho apresenta uma característica ímpar já que os vasos retinianos estão na superfície da retina, o que talvez propicie uma ação mais eficaz dos fatores angiogênicos aplicados na cavidade vítrea se comparada à retina de outros animais que apresentam vasos intraretinianos. Apesar da anatomia retiniana do coelho ser significativamente diferente da humana, especialmente pela falta da mácula, a indução, proliferação, hemorragia e o descolamento tracional de retina nesse modelo animal é um paralelo muito próximo à resposta clínica humana para a angiogênese patológica.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo descreve um simples, eficiente, sustentável, confiável e reprodutível modelo animal de neovascularização retiniana, utilizando injeções intravítreas de VEGF165, o qual foi bem documentado com retinografia, angiofluoresceinografia, OCT e análise histopatológica. Uma injeção de angiogênico cria a neovascularização de retina que regride após sete dias. Já duas aplicações criam uma neovascularização mais intensa o que, após quatro semanas, evolui com descolamento de retina.

## REFERÊNCIAS

ADAMIS, A.P.; SHIMA, D.T.; YEO, K.T.; YEO, T.K.; BROWN, L.F.; BERSE, B.; D'AMORE, P.A.; FOLKMAN, J. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 193, n. 2, p. 631-8. 1993.

ADAMIS, A.P.; SHIMA, D.T. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. **Retina.** v. 25, n. 2, p. 111-8. 2005.

AIELLO, L.P.; AVERY, R.L.; ARRING, P.G.; KEYT, B.A.; JAMPEL, H.D.; SHAH, S.T.; PASQUALE, L.R.; THIEME, H.; IWAMOTO, M.A.; PARK, J.E.; NGUYEN, M.S.; AIELLO, L.M.; FERRARA, N.; KING, G.L. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. **N Engl J Med.** v. 331, p. 1480-1487, 1994.

AIKACEM, N.; YOSHIZAWA, T.; NELSON, K.D.; WILSON, C.A. Quantitative MR imaging study of intravitreal sustained release of VEGF in rabbits. **Invest ophthalmol Vis Sci.** v. 41, n. 6, p. 1561-69. 2000.

AL-LATAYFEH, M.M.; SUN, J.K.; AIELLO, L.P. Ocular coherence tomography and diabetic eye disease. **Semin Ophthalmol.** v. 25, n. 5, p. 192-7, 2010.

AMERI, H.; CHADER, G.J.; KIM, J.G.; SADDA, S.R.; RAO, N.A.; HUMAYUN, M.S. The effects of intravitreal bevacizumab on retinal neovascular membrane and normal capillaries in rabbits. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 48, n. 12, p. 5708–15. 2007.

AVERY, R.L. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. **Retina.** v. 26, n. 3, p. 35204. 2006.

ASHTON, N.; WARD, B.; SERPELL, G.; Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. **Br J Ophthalmol.** v. 38, n. 7, p. 397-432. 1954.

BAFFERT T.; SENNINO, B.; THURSTON, G.; KUO, C.J.; HU-LOWE, D.; MCDONALD, M.D. Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. **AM J Physiol.** v. 290, n. 2, p. 547-59. 2006.

BHISITKUL, R.B. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. **Br J Ophthalmol.** v. 90, n. 12, p. 1542-7. 2006.

BLUMENKRANZ, M.S.; MOSHFEGHI D.M. Pharmacotherapy of Age-Related Macular Degeneration. In: STEPHEN J.R. **Retina.** Estados Unidos: Elsevier, 2006. p. 1211- 39.

CAO, Y.; CHEN, H.; ZHOU, L.; CHIANG, M.K.; ANAND-APTE, B.; WEATH-ERBEE, J.A.; WANG, Y.; FANG, F.; FLANAGAN, J.G.; TSANG, M.L. Heterodimers of placenta growth factor vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to FIK-1/KDR. **J Biol Chem.** v. 27,n. 6,p. 3154-62. 1996.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature.** v. 14, n. 407, p. 249-57. 2000.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med.** v. 9, n. 6, p. 653-60, 2003.

CLEAVER, O.; MELTON D.A. Endothelial signaling during development. **Nat Med.** v. 9, n. 6, p.661-8, 2003.

CUGATI, S.; WANG, J.J.; ROCHTCHINA, E.; MITCHELL, P. Ten-year incidence of retinal vein occlusion in an older population: the Mountains Eye Study. **Arch Ophthalmol.** v. 124, n. 5, p. 726-32. 2006.

DAWSON, D.W.; VOLPERT, O.V.; GILLIS, P.; CRAWFORD, S.E.; XU, H.; BENEDICT, W.; BOUCK, N.P. Pigment epithelium derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. **Science.** v. 285, n. 5425, p. 254-8. 1999.

DEEM, C.W.; FUTTERMAN, S.; KALINA, R.E. Induction of endothelial cell proliferation in rat venules by chemical and indirect physical trauma. **Invest. Ophthalmol.** v. 13, n. 8, p. 580-5. 1974.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LeCOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med.** v. 9, n. 6, p 669-76. 2003.

FINKELSTEIN, D.; BREM, S.; PATZ, A.; FOLKMAN, J.; MILLER, S.; HO-CHEN, C. Experimental retinal neovascularization induced by intravitreal tumors. **Am J Ophthalmol.** v. 83, n. 5, p. 660-4. 1977.

FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med.** v. 285, n. 21, p. 1182-6, 1971.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J Biol Chem.** v. 267, n. 16, p. 10931-4. 1992.

FOLKMAN, J. KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science.** v. 23, n. 235, p. 442-47. 1987.

FREUND, K.B.; HO, I.V.; BARBAZETTO, I.A.; KOIZUMI, H.; LAUD, K.; FERRARA, D.; MATSUMOTO, Y.; SORENSON, J.A.; YANNUZZI, L. Type 3 neovascularization: the expanded spectrum of retinal angiomatous proliferation. **Retina.** v. 28, n. 2, p. 201-11. 2008.

GRANT, D.S.; KLEINMAN, H.K.; GOLDBERG, I.D.; BHARGAVA, M.M.; NICKOLOFF, B.J.; KINSELLA, J.L. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 90, n. 5, p. 1937-41. 1993.

HAYREH, S.S.; ZIMMERMAN, B.; McCARTHY, M.J.; PODHAJSKY, P. Systemic diseases associated with various types of retinal vein occlusion. **Am J Ophthalmol.** v. 131, n. 1, p. 61-77. 2001.

HEATH, P. Pathology of the retinopathy of prematurity: retrolental fibroplasia. **Am J Ophthalmol.** v. 34, n. 9, p. 1249-59. 1951.

HOGAN, M.J.; ALVARADO, J.A.; WEDDELL, J.E. Histology of the human eye: an atlas and textbook. Saunders 1971.

HSU, J.; KAISER, R.S.; SIVALINGAM, A.; ABRAHAM, P.; FINEMAN, M.S.; SAMUEL, M.A.; VANDER, J.F.; REGILLO, C.D.; HO, A.C. Intravitreal bevacizumab (avstin) in central retinal vein occlusion. **Retina.** v. 27, n. 8, p. 1013-9. 2007.

HAMILTON, A.M.; MARSHALL, J.; KOHNER, E.M.; BOWBYES, J.A. Retinal new vessel formation following experimental vein occlusion. **Exp. Eye Res.** v. 20, n. 6, p. 493-7. 1975.

ISHIDA, S.; USUI, T.; YAMASHIRO, K.; AMANO, S.; OGURA, Y. VEGF-164 mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. **J Exp Med**. v. 198, n. 3, p. 483-489. 2003.

JULIEN, S.; KREPPEL, F.; BECK, S.; HEIDUSCHKA, P.; BRITO, V.; SCHNICHELS, S.; KOCHANNEK, S.; SCHRAERMEYER, U. A reproducible and quantifiable model of choroidal neovascularization induced by VEGF A165 after subretinal adenoviral gene transfer in the rabbit. **Mol Vis**. v. 14, p. 1358-72. 2008.

KARKKAINEN, M.J.; MAKINEN, T.; ALITALO, K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. **Nat Cell Biol**. v. 4, n. 1, p. E2-5. 2002.

KEATING, A.M.; JACOBS, D.S. Anti-VEGF Treatment of Corneal Neovascularization. **Ocul Surf**. v. 9, n. 4, p. 227-37. 2011.

KIMOTO, K.; KUBOTA, T. Anti-VEGF agents for ocular angiogenesis and vascular permeability. **J Ophthalmology**. 852183. 2012.

KIMURA, H.; SAKAMOTO, T.; HINTON, D.R.; SPEE, C.; OGURA, Y.; TABATA, Y. A new model of subretinal neovascularization in the rabbit. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v. 36, n. 10, p. 2110-9. 1995.

KNIGHTON, D.R.; HUNT, T.K.; SCHEUENSTUHL, H.; HALLIDAY, B.J.; WERB, Z.; BANDA, M.J. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. **Science**. v. 23, n. 221, p. 1283-5. 1983.

KLEIN, R. Retinopathy in a population-based study. **Trans Am Ophthalmol Soc**. v. 90, p. 561-94. 1992.

KLEIN, R.; KLEIN, B.E.; MOSS, S.E. Visual impairment in diabetes. **Ophthalmology**. v. 91, p. 1-9, 1984.

LEE, P.; WANG, C.C.; ADAMIS, A.P. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. **Surv Ophthalmol**. v. 43, n. 3, p. 245-69. 1998.

LUCENA, D.; YAMANE, R. Antiangiogênicos no glaucoma. **Rev. bras. oftalmol**. v. 67, n. 6, p.313-20. 2008.

MAGLIONE, D.; GUERRIERO, V.; VIGLIETTO, G.; DELLI-BOVI, P.; PERSICO, M.G. Isolation of a human placenta cDNA coding for a pr coding for a protein related to the vascular permeability factor. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 88, n. 20, p. 9267-71. 1991.

MAIA, H.S. Retinografia e angiografia fluoresceínica. In: RIUITIRO Y. **Semiologia Ocular**. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2003. p. 185-213.

MESQUITA, J.R.S.; GUIA, T.; AGGIO, F.B.; FARAH, M.E. Princípios físicos. In: FARAH, M.E. **Tomografia de Coerência Óptica**. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2010. p. 9-11.

MOHAMED, Q.; GILLES, M.C.; WONG, T.Y. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. **JAMA**. v. 298, n. 8, p. 902-16. 2007.

OKAMOTO, N.; TOBE, T.; HACKETT, S.; OSAKI, H.; VINOES, M.; LaROCHELLE, W.; ZACK, D.; CAMPOCHIARO, P.A. Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. **Am J Pathol**. v. 151, n. 1, p. 281-91. 1997.

OZAKI, H.; HAYASHI, H.; VINOES, S.A; MOROMIZATO, Y.; CAMPOCHIARO, P.A. Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates. **Exp Eye Res**. v. 64, n. 4, p. 505-17. 1997.

OZAKI, H.; SEO, M.S.; OZAKI, K.; YAMADA, H.; YAMADA, E.; OKAMOTO, N.; HOFMANN, F.; WOOD, J.M.; CAMPOCHIARO, P.A. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. **Am J Pathol**. v. 156, n. 2, p. 697-707. 2000.

OSIAC, E.; SAFTOIU, A.; GHEONEA, D.I.; MANDRILA, I.; ANGELESCU, R. Optical coherence tomography and Doppler optical coherence tomography in the gastrointestinal tract. **World J gastroenterol**. v. 17, n 1, p. 15-20, 2011.

PATERNOSTRO, C.; DAVID, E.; PAROLA, M. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. **World J gastroenterol**. v. 16, n. 3, p. 281-8. 2010.

PATZ, A. Retrolental fibroplasia (retinopathy of prematurity). **Am J Ophthalmol**. v. 94, n. 4, p. 552-4. 1982.

PENN, J.; TOLMAN, B.; LOWERY, L. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 3, n. 34, p. 576-85. 1993.

PENN, J.S.; MADAN, A.; CALDWELL, R.B.; BARTOLI, M.; CALDWELL, R.W.; HARTNETT, M.E. Vascular endothelial growth factor in eye disease. **Prog Retin Eye Res.** v. 27, n. 4, p 331-71. 2008.

PEPPER, M.S. Transforming growth factor-beta: vasculogênese, angiogenesis, and vessel wal integrity. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 8, n. 1, p. 21-43. 1997.

PEYMAN, E.J.; HEUSSEN, F.M.; THORNE, J.E.; CASPARIS, H.; PATEL, S.J.; DO, D.V. Progression of macular ischemia following intravitreal bevacizumab. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging.** v. 40, n. 3, p. 316-8. 2009.

PIERCE, E.; AVERY, R.; FOLEY, E.D.; AIELLO, L.P.; SMITH, L.E.H. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 92, n. 3, p. 905-9. 1995.

PINHO, M.S.L., Angiogênese. **Rev Bras Coloproct.** v. 25, n. 4, p. 296-402. 2005.

POURNARAS, C.J.; TSACOPOULOS, M.; STROMMER, K.; GILODI, N.; LEUNENBERGER, P.M. Experimental retinal branch vein occlusion in miniature pigs induces local tissue hypoxia and vasoproliferative microangiopathy. **Ophthalmology.** v. 97, n. 10, p. 1321-8. 1990.

PRAGER, F.; MICHELS, S.; KRIECHBAUM, K.; GEORGOPOULOS, M.; FUNK, M.; GEITZENAUER, W.; POLAK, K.; SCHMIDT-ERFURTH, U. Bevacizumab (Avastin) for macular oedema secondary to retinal vein occlusion: 12-month results of a prospective clinical trial. **Br J Ophthalmol.** v. 93, n. 4. p. 452-6. 2009.

QAZI, Y.; MADDULA, S.; AMBATI, B.K. Mediators of ocular angiogenesis. **J. Genet.** v. 88, n. 4, p.495-515. 2009.

QUI, G.; STEWART, J.M.; SADDA, S.; FREDI, R.; LEE, S.; GUVEN, D.; de JUAN, E.; VARNER, S.E. A new model of experimental subretinal neovascularization in the rabbit. **Exp Eye Res.** v. 83, n. 1, p. 141-52. 2006.

RITTER, M.; ELLEDGE, J.; SIMADER, C.; DEAK, G.G.; BENESCH, T.; BLODI, B.A.; SCHMIDT-ERFURTH, U.M. Evaluation of optical coherence tomography in age-related macular degeneration: a reproducibility study of two independent reading centers. **Br J Ophthalmol**. v. 95, n. 3, p. 381-5. 2011.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**. v. 386, p. 671-4. 1997.

ROSENFELD, P.J.; BROWN, D.M.; HEIER, J.S. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. **N Engl J Med**. v. 355, p.1419-1431, 2006.

ROSENFELD, P.J.; BROWN, D.M.; HEIER, J.S.; BOYER, D.S.; KAISER, P.K.; CHUNG, C.Y.; KIM, R.Y.; MARINA STUDY GROUP. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. **N Engl J Med**. v. 355, n. 14, p. 1419-31. 2006.

SAATI, S.; AGRAWAL, R.N.; LOUIE, S.; CHADER, G.J.; HUMAYUN, M.S. Effect of multiple injections of small divided doses vs single injection of intravitreal bevacizumab on retinal neovascular model in rabbits. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. v. 248, n. 4, p. 457-66. 2010.

SAMPAIO, R.B.; MENDONCA R.J.; SIMIONI, A.R.; COSTA, R.A.; SIQUEIRA, R.C.; CORREA, V.M.; TEDESCO, A.C.; COUTINHO-NETTO, J. HAENDCHEN, H.A.; JORGE, R. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic derived fraction: an experimental model. **Cur. Eye Res**. v. 35, n. 1, p. 56-62. 2010.

SEDDON, J.M.; CHEN, C.A. The epidemiology of age-related macular degeneration. **Int Ophthalmol Clin**. v. 44, n. 4, p. 17-39. 2004.

SENGER, D.R.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M.; PERRUZZI, C.A.; HARVEY, V.S.; DVORAK, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**. v. 219, n. 4587, p. 983-5. 1983.

SENGER, D.R.; CONNOLLY, D.T.; VAN DE, W.L.; FEDER, J.; DVORAK, H.F. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. **Cancer Res**. v. 50, n. 6, p.1774-8. 1990.

SHIMURA, M.; YASUDA, K. Macular ischaemia after intravitreal bevacizumab injection in patients with central retinal vein occlusion and a history of diabetes and vascular disease. **Br J Ophthalmol**. v. 94, n. 3, p. 381-3. 2010.

SOHEILIAN, M.; RAMEZANI, A.; OBUDI, A.; BIJANZADEH, B. PEYMAN, G.A. Randomized trial of intravitreal bevacizumab alone or combined with triancinolone

versus macular photocoagulation in diabetic macular edema. **Ophthalmology**. v. 116, p. 1142-1150, 2009.

STAHN, A.; CONNOR, K.M.; SAPIEHA, P.; CHEN, J.; DENNISON, R.J.; KRAH, N.M.; SEAWARD, M.R.; WILLETT, K.L.; ADERAMAN, C.M.; GUERIN, K.I.; HUA, J.; LOFQVIST, C.; HELLSTROM, A.; SMITH, L.E. The mouse retina as an angiogenesis model. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v. 51, n. 6, p. 2813-26. 2010.

TALLQUIST, M.; KAZLAUSKAS, A. PDGF signaling in cells and mice. **Cytokine Growth Factor Rev**. A. v. 15, n. 4, p. 205-13. 2004.

TANO, Y.; CHANDLER, D.; MACHEMER, R. Retinal neovascularization after intravitreal fibroblast injection. **Am J Ophthalmol**. v. 92, n. 1, p. 103-9. 1981.

TOLENTINO, M.J.; MILLER, J.W.; GRAGOUDAS, E.S.; CHATZISTEFANO, K.; FERRARA, N.; ADAMIS, A.P. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. **Arch Ophthalmol**. v. 114, n. 8, p. 964-70. 1996.

TOLENTINO, M.J.; McLEOD, D.S.; TAOMOTO, M.; OTSUJI, T.; ADAMIS, A.P.; LUTTY, G.A. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the non-human primate. **Am J Ophthalmol**. v. 133, n. 3, p. 373-85. 2002.

VALIATTI, F.B.; CRISPIM, D.; BENFICA, C.; VALIATTI, B.B.; KRAMER, C.K.; CANANI, L.H. Papel do fator de crescimento vascular endothelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 55, n. 2, p. 106-13. 2011.

VEIKKOLA, T.; ALITALO, K. VEGFs, receptors and angiogenesis. **Semin Cancer Biol**. v. 9, n. 3, p. 211-20. 1999.

WELLS, J.A.; MURTHY, R.; CHIBBER, R.; NUNN, A.; GERGOR, Z.J. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularization. **Br J Ophthalmol**. v. 80, p. 363-366, 1996.

WILLARD, A.L.; HERMAN, I.M. Vascular complications and diabetes: current therapies and future challenges. **Ophthalmol**. 209538. 2012.

WONG, C.G.; RICH, K.A.; LIAW, L.H.; HSU, H.T.; BERNIS, M.W. Intravitreal VEGF and bFGF produce florid retinal neovascularization and hemorrhage in the rabbit. **Curr Eye Res.** v. 22, n. 2, p.140-7. 2001.

WU, L.; PORRAS, A.; BENAVIDES, R.; ZEBALLOS, D.; AREVALO, F. Angiography of retinal vascular diseases. In: AREVALO F. **Retinal Angiography and Optical Coherence Tomography.** New York: Springer, 2009. p. 105-32.

WU, L.; MARTINEZ-CASTELLANOS, M.A.; QUIROZ-MERCADO, H.; AREVALO J.F.; BERROCAL, M.H.; FARAH, M.E.; MAIA, M.; ROCA, J.A.; RODRIGUES, F.J.; PAN AMERICAN COLLABORATIVE RETINA GROUP (PACORES). Twelve-month safety of intravitreal injections of bevacizumab (Avastin): results of the Pan-American collaborative retina study group (PACORES). **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.** v. 246, n. 1, p. 81-7. 2008.

ZYSK, A.M.; NGUYEN, F.T.; OLDENBURG, A.L.; MARKS, D.L.; BOPPART, S.A. Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside. **Journal of Biomedical Optics.** v. 12, n 5, p. 051403, 2007.