

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Neovascularização retiniana induzida por
fração angiogênica derivada do látex:
modelo experimental em coelhos**

Aluna: Romina Barreto Sampaio

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Jorge

Ribeirão Preto

2007

Romina Barreto Sampaio

**Neovascularização retiniana induzida por
fração angiogênica derivada do látex:
modelo experimental em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Jorge

Ribeirão Preto

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Sampaio, Romina Barreto

Neovascularização retiniana induzida por fração angiogênica derivada do látex: modelo experimental em coelhos. Ribeirão Preto, 2007.

100 p.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: oftalmologia.

Orientador: Jorge, Rodrigo.

1. Angiogênese. 2. Doenças vasculares da retina. 3. Fator de crescimento vascular endotelial. 4. Látex. 5. Modelo experimental. 6. Neovascularização. 7. Sistema de liberação lenta.

DEDICATÓRIA:

Aos meus queridos pais, Roberto e Elza, ao meu esposo Sérgio, e aos meus irmãos Roberta, Ricardo e Renata, pelo apoio constante em cada caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir-me crescer profissionalmente e pela força que me concede para alcançar objetivos.

Aos meus pais, que sempre investiram em mim e torceram por mim em todos os momentos, permitindo alcançar meus sonhos.

Aos meus irmãos, por todo o carinho, amor, respeito e admiração.

Ao meu esposo Sérgio, e seus pais Dr. Maurício e Helena, pelo estímulo constante.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Jorge, pela orientação e pelo apoio constante, cujo espírito científico tornou-se grande incentivo em todas as etapas da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Coutinho, pela pessoa extraordinária e pela valiosa contribuição e amplo conhecimento, proporcionando-me realizar este estudo.

Ao Ricardo Mendonça e Andeza Simioni, pela preparação das amostras do estudo com todo carinho e dedicação.

Ao Prof. Dr. Antônio Haddad, pela ajuda na obtenção das imagens histológicas.

À Vânia , à Tuca, à Tereza, à Izilda, pela enorme ajuda e precioso empenho.

Ao Prof. Dr. Tedesco, pela grande contribuição do seu departamento.

A todos do setor de Cirurgia Experimental, pela receptividade e interesse pelo sucesso do trabalho.

À minha amiga Leticia Paccola, que me acolheu em todos os momentos.

Ao Dr. Paulo Imamura, pela valiosa ajuda.

Ao meu primo Nelson, pelo cuidado e incentivo nesta caminhada.

À Cecília, Amélia, Rita, Rogério, Ivone e Edson do Departamento de Oftalmologia, pela amizade.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À CAPES e FAEPA, pelo auxílio financeiro para a realização da pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia microscópica da retina, ilustrando suas 10 camadas. EPR - epitélio pigmentado da retina; CFR - camada de fotorreceptores; MLE - membrana limitante externa; CNE - camada nuclear externa; CPE - camada plexiforme externa; CNI - camada nuclear interna; CPI - camada plexiforme interna; CG - camada de células ganglionares; CFN - camada de fibras nervosas; MLI - membrana limitante interna (adaptado de HOGAN et al, 1971).....**8**

Figura 2 - Retinografia demonstrando neovasos retinianos (em destaque) em paciente com retinopatia diabética (figura doada pelo Prof. Dr. Rodrigo Jorge).....**22**

Figura 3 - Coleta do látex. **(A)** Fotografia de um seringal localizado no interior de São Paulo, demonstrando a plantação organizada das seringueiras. **(B)** Detalhe da incisão, em meia espiral, na casca da seringueira. **(C)** Correto procedimento da coleta do látex (figura doada por Ricardo Mendonça).....**35**

Figura 4 - Figura esquemática da metodologia utilizada neste estudo. **(A)** Injeção intravítrea das microesferas no olho direito do coelho. **(B e C)** Acompanhamento semanal dos coelhos com retinografia e angiografia fluoresceínica durante 28 dias. **(D)** Olho enucleado para avaliação histopatológica.....**40**

Figura 5 - Sala de procedimento e material usado para o estudo. **(A)** Sala de procedimento. **(B)** Coelho anestesiado previamente aos procedimentos. **(C)** Material usado para injeção intravítrea das microesferas e avaliação semanal dos animais com oftalmoscopia indireta, retinografia e angiografia fluoresceínica.....**41**

Figura 6 - Olho de coelho enucleado para estudo histológico.....**42**

Figura 7 - Fotografias da retina do coelho 2 do **grupo I**. **(A)** Retinografia colorida antes da injeção intravítrea das microesferas contendo 10µg da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(B, C e D)** Aneritra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente, realizadas 28 dias após a injeção intravítrea da FAL demonstrando aumento da tortuosidade vascular e alterações telangiectásicas. Não se observa a presença de neovasos.....**48**

Figura 8 - Fotografias da retina coelho do 3 do **grupo II**. **(A)** Retinografia colorida antes da injeção intravítrea das microesferas contendo 30µg da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(B, C e D)** Aneritra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente, realizadas 7 dias após a injeção intravítrea da FAL demonstrando alterações vasculares com aumento da tortuosidade e telangiectasias.....**50**

Figura 9 - Seqüência fotográfica da retina do coelho 3 do **grupo II** realizadas 21 dias após a injeção intravítrea das microesferas contendo 30µg da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL) demonstrando hiperfluorescência progressiva do disco sugestiva de neovascularização.....**51**

Figura 10 - Fotografias da retina do coelho 3 do **grupo II**. **(A)** Retinografia colorida antes da injeção intravítrea das microesferas contendo 30µg da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(B, C e D)** Aneritra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente, realizadas 28 dias após a injeção intravítrea da FAL demonstrando proliferação fibrovascular retiniana.....**52**

Figura 11 - Fotografias da retina do coelho 5 do **grupo III**. **(A)** Retinografia colorida antes da injeção intravítrea das microesferas contendo 50µg da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(B, C e D)** Aneritra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente, realizadas 14 dias após a injeção intravítrea da FAL demonstrando hiperfluorescência progressiva ao longo dos raios medulares sugestiva de neovascularização..... **54**

Figura 12 - Seqüência fotográfica da retina do coelho 5 do **grupo III** realizadas 21 dias após a injeção intravítrea das microesferas contendo 50µg da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). Observa-se hiperfluorescência progressiva ao longo dos raios medulares sugestiva de neovascularização e proliferação fibrovascular retiniana.....**55**

Figura 13 - Fotografias da íris do coelho 5 do **grupo III**, realizadas 21 dias após a injeção intravítrea das microesferas contendo 50µg da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(A, B, C e D)** Fotografia colorida, aneritra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente. Observa-se hiperfluorescência progressiva dos vasos irianos, principalmente no bordo da íris, sugestiva de neovascularização de íris.....**56**

Figura 14 - Fotografias da retina do coelho 2 do **grupo IV - grupo controle**. **(A)** Retinografia colorida antes da injeção intravítrea das microesferas sem a fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(B, C e D)** Aneritra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente, realizadas 28 dias após injeção intravítrea das microesferas sem o FAL. Não foram verificadas alterações vasculares, como tortuosidade, hemorragias ou formação de neovasos de retina neste grupo durante todo o período estudado.....**57**

Figura 15 - Fotografias da íris do coelho 2 do **grupo IV – grupo controle**, realizadas 28 dias após a injeção intravítrea das microesferas sem a fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(A, B, C e D)** Fotografia colorida, aneritra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente. Não se observou neovascularização de íris neste grupo durante todo o período estudado.....**58**

Figura 16 - Fotomicrografias do segmento posterior do olho de coelhos do **grupo IV (A)** e do **grupo III (B,C)**, mostrando a região de fibras nervosas e da cabeça do nervo óptico. **(A)** Secção de parafina corada com H.E. A cabeça do nervo preenche praticamente toda a área da foto e exibe características morfológicas comparáveis às do olho normal. No lado esquerdo superior, visualiza-se a retina artificialmente descolada pela técnica histológica (H.E., x40). **(B)**. Corte semifino (0,5µm de espessura) corado com azul de toluidina, demonstrando a cabeça do nervo óptico. Adjacente à cabeça do nervo óptico, apresenta tecido fibrovascular com vários conglomerados de células endoteliais imaturas, melhor identificadas (área em destaque) na figura (C). O asterisco indica reação inflamatória crônica secundária ao depósito de microesferas no vítreo. Observa-se, também, o desenvolvimento de tecido neovascular entre a cabeça do nervo óptico e o depósito vítreo de microesferas (azul de toluidina, x40). **(C)** Magnificação da área dentro do retângulo em (B). O novo tecido formado está próximo à cabeça do nervo óptico. Observa-se a presença de infiltrado linfocítico e vasos sanguíneos em formação (neovasos), representados por setas. A cabeça de seta indica o lúmen do neovaso (azul de toluidina, x200).....**59**

Figura 17 - Fotomicrografia em corte semifino (0,5µm de espessura), corado com azul de toluidina, do segmento posterior do olho experimental do coelho 5 do **grupo III - 50µg/0,1ml**, contendo microesferas com a fração angiogênica do látex (FAL), mostrando a região da cabeça do nervo óptico. Observa-se a presença de infiltrado linfocítico e vasos sanguíneos em formação (neovasos), representados pelas setas. A cabeça de seta indica o lúmen do neovaso (azul de toluidina, x200).....**60**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG (1 a 4)	angiopoetinas (1 a 4)
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CFN	camada de fibras nervosas
CFR	camada de fotorreceptores
CG	camada ganglionar
CNE	camada nuclear externa
CNI	camada nuclear interna
CPE	camada plexiforme externa
CPI	camada plexiforme interna
DMRI	degeneração macular relacionada à idade
EPR	epitélio pigmentar da retina
FAL	fração angiogênica derivada do látex
FGF	fator de crescimento fibroblástico
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
H.E.	Hematoxilina-eosina
HIF-1	fator induzido por hipóxia 1
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina
KDa	kilodalton
LAF	látex angiogenic fraction
MCA	membrana corio-alantóidea
MLE	membrana limitante externa
MLI	membrana limitante interna
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NV	neovascularização
OVCR	oclusão da veia central da retina
PCK-B	proteína quinase C fração B
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF- α	fator de crescimento transformante alfa
TGF- β	fator de crescimento transformante beta
PLA	polímero derivado do ácido láctico
PLGA	polímero derivado do ácido láctico e glicólico
RD	retinopatia diabética
RDP	retinopatia diabética proliferativa
ROP	retinopatia da prematuridade
VEGF	vascular endothelial growth factor (fator de crescimento vascular endotelial)

LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
KDa	kilodalton
Kg	kilograma
µg	micrograma
µm	micrômetro
mg	miligrama
M	molar
°C	grau Celsius
O ₅ O ₄	tetróxido de ósmio
pH	potencial de hidrogênio

RESUMO

O objetivo do estudo foi desenvolver um modelo experimental de neovascularização retiniana em coelhos utilizando, como fator angiogênico, uma fração purificada derivada do látex natural (FAL).

A FAL foi encapsulada em microesferas de polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico (PLGA), formando um sistema de liberação lenta do fator, e introduzido no olho direito de cada animal através da injeção intravítrea de 0,1ml da solução. Foram utilizados 32 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, separados em 4 grupos de 8 animais. Os grupos I, II e III receberam microesferas contendo a FAL nas quantidades específicas de 10µg, 30µg e 50µg, respectivamente, e o grupo IV recebeu microesferas sem a fração angiogênica (grupo controle). Acompanhamento semanal dos animais com os exames de oftalmoscopia e angiografia fluoresceínica foi realizado, quando então se procedeu a enucleação na 4ª semana para estudo histopatológico.

Todos os olhos do grupo I demonstraram aumento da tortuosidade vascular, associado a alterações telangiectásicas e hemorragias puntiformes 14 dias após a injeção, mantendo-se até a 4ª semana, porém sem a presença de neovasos. Os do grupo II apresentaram alterações vasculares semelhantes às do grupo I, sendo que cinquenta por cento deste grupo desenvolveu neovascularização retiniana, verificada à angiografia 21 dias após a injeção, evoluindo com tração fibrovascular no 28º dia. Todos os animais do grupo III

apresentaram acentuada tortuosidade vascular e neovasos retinianos a partir da 2ª semana do estudo, progredindo para tração fibrovascular e descolamento tracional da retina. Não foram observadas alterações vasculares ou neovasos nos olhos do grupo IV. O estudo histopatológico do tecido retiniano confirmou a presença de neovasos nos grupos II e III, previamente demonstrados no exame de angiografia fluoresceínica, não observados no grupo controle.

Os resultados mostraram que a injeção intravítrea de 30µg e de 50µg da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL) foi capaz de induzir a formação de neovasos em retina de coelhos. A relevância desse trabalho foi o desenvolvimento de um modelo de neovascularização retiniana simples, utilizando-se uma droga barata, facilmente encontrada na natureza: o látex de seringueira.

Palavras-chaves: angiogênese; doenças vasculares da retina; fator de crescimento vascular endotelial; látex; modelo experimental; neovascularização; sistema de liberação lenta.

ABSTRACT

The purpose of this study was to create a retinal neovascularization experimental model in rabbit using intravitreal injections of a latex-derived angiogenic fraction (LAF).

LAF was encapsulated in PLGA (L-lactide-co-glycolide) microspheres, and injected intravitreally in the rabbits' right eyes. Thirty-two albino New Zealand rabbits, divided in 4 groups of 8 animals, were enrolled in this study. Group I, II and III received microspheres with 10 μ g, 30 μ g and 50 μ g of LAF, respectively, and group IV received 0,1 ml of microspheres without the angiogenic factor. Weekly follow-up with ophthalmoscopy and fluorescein angiography was performed, when the rabbits were sacrificed in the 4th week and their eyes processed for light microscopy.

All eyes from group I demonstrated retinal vascular tortuosity, associated with micro-hemorrhages, observed 14 days after injection, maintained for 28 days, otherwise without new vessels presence. All group II eyes showed vascular changes similar to group I. Fifty per cent of the eyes from group II rabbits developed retinal neovascularization 21 days after injection. All eyes from group III demonstrated important vascular tortuosity and retinal new vessels 2 weeks after injection, progressing to fibrovascular proliferation and tractional retinal detachment. No vascular changes or retinal new vessels were observed in group IV eyes. Light microscopy confirmed new vessels previously seen on

fluorescein angiography, in retinal sections adjacent to the optic disc, not observed in sections at the same area in control group.

Our findings showed that 30 and 50 μ g of latex angiogenic factor injected in the vitreous induced experimental retinal neovascularization in rabbits. The relevance of this study was the development of a simple retinal neovascularization model, using an inexpensive drug, easily found in nature: latex from rubber tree.

Key-Words: angiogenesis; experimental model; latex; neovascularization; retinal vascular diseases; sustained release system; vascular endothelial growth factor (VEGF).

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ANATOMIA DA RETINA.....	3
1.2 ANGIOGÊNESE	9
1.2.1 Angiogênese patológica.....	11
1.2.2 Fatores angiogênicos.....	12
1.2.3 Fator de crescimento vasoendotelial (VEGF).....	14
1.3 MODELOS DE NEOVASCULARIZAÇÃO	16
1.4 DOENÇAS VASCULARES DA RETINA.....	19
1.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA	24
1.6 FRAÇÃO ANGIOGÊNICA DERIVADA DO LÁTEX	29
1.7 RELEVÂNCIA DO ESTUDO	30
2 OBJETIVO	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS (FAL).....	34
3.2 PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS.....	36
3.3 ANIMAIS	37
3.4 IMPLANTE INTRAVÍTREO DAS MICROESFERAS	38
3.5 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS	39
3.6 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	42

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS	45
4.1 GRUPO I	47
4.2 GRUPO II	49
4.3 GRUPO III	53
4.4 GRUPO IV	57
4.5 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	59
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

INTRODUÇÃO

As doenças vasculares da retina são uma das principais causas de cegueira da humanidade (KLEIN et al, 1984). A patogênese em comum destas doenças é o comprometimento crônico do suprimento sanguíneo do tecido retiniano, levando à isquemia do mesmo. Estas áreas isquêmicas induzem a produção de diversos fatores angiogênicos e, conseqüentemente, estimulam a neovascularização (NV) retiniana. Dentre estes fatores, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é o principal responsável nas doenças oculares caracterizadas por NV (MILLER et al, 1994, 1997; ADAMIS et al, 1994).

Pesquisas no campo da angiogênese ocular vêm sendo desenvolvidas há anos, no intuito de melhor compreender seus mecanismos e, assim, obter a habilidade do controle da angiogênese patológica e tratamento das retinopatias vasculares. Modelos experimentais de neovascularização ocular criados nos últimos anos, utilizando o VEGF como fator angiogênico, demonstraram que a injeção intravítrea do fator em olhos normais induziu o processo patológico semelhante à retinopatia diabética (TOLENTINO et al., 1995,1996, 2002), e que níveis elevados com liberação contínua de VEGF no vítreo foram requeridos para o desenvolvimento de neovasos (OZAKI et al., 1997). Por outro lado, o bloqueio do VEGF levou à inibição da neovascularização iriana e à supressão da formação de neovasos retinianos em animais (AIELLO et al., 1995). Recentemente, novos estudos com o desenvolvimento de drogas anti-angiogênicas, como anti-VEGF, vêm sendo realizados *in vivo* para o tratamento destas doenças vasculares retinianas (CUNNINGHAM et al., 2005; ROSENFELD et al., 2005; ADAMIS et al., 2006; SPAIDE; FISHER, 2006). Porém, a utilização

deste fator, o VEGF, tem como desvantagem o custo elevado desta substância, dificultando a ampliação do seu uso para pesquisas em terapias anti-angiogênicas em modelos experimentais direcionados para o controle destas doenças neovasculares isquêmicas (Catálogo SIGMA, 5µg corresponde a US\$ 500).

Portanto, o desenvolvimento de um modelo experimental de neovascularização retiniana de fácil acesso, menos oneroso, para o estudo das drogas anti-angiogênicas poderia ser útil.

1.1 ANATOMIA DA RETINA

Um breve resumo sobre a estrutura anatômica da retina é necessário para a compreensão do assunto deste trabalho. A maioria das informações sobre a morfofisiologia da retina foram retiradas da clássica obra de Hogan, Alvarado e Weddell (HOGAN et al., 1971).

O nome retina provém do latim *rete*, que significa *rede*. A retina é um tecido fino e transparente, correspondendo à camada mais interna do globo ocular. Sua superfície interna está em contato com o corpo vítreo. Posteriormente, todas as camadas, exceto a camada de fibras nervosas, terminam no nervo óptico. Anteriormente, estende-se em direção ao corpo ciliar. Externamente, encontra-se em contato com a membrana de Bruch da coróide (HOGAN et al., 1971).

Trata-se da estrutura, funcionalmente, responsável pela captação e transdução dos estímulos luminosos, para a qual utiliza células receptoras

específicas, denominadas fotorreceptores. Esses podem ser divididos em dois tipos básicos: cones e bastonetes. Essas células são altamente especializadas e complexas, contendo fotopigmentos que absorvem a luz e a transformam em impulsos elétricos.

Microscopicamente, a retina é formada por 10 camadas, cuja disposição da mais externa para interna é mostrada a seguir (figura 1). A retina humana e a de coelho são semelhantes, com algumas características específicas nos coelhos que destaco a seguir (PRINCE et al., 1964).

1) O epitélio pigmentado da retina (EPR) é uma monocamada de células cubóides. Além de desempenhar um papel fundamental no metabolismo da retina, reciclando o pigmento visual (WALD, 1968), contém grânulos de melanina que absorvem a luz e evitam a reflexão da mesma para o interior da cavidade vítrea. Em coelhos albinos, é livre de pigmentos.

2) A camada de fotorreceptores (CFR) é composta por segmentos internos e externos dos cones e bastonetes. O segmento interno de fotorreceptores é constituído predominantemente por organelas celulares, incluindo mitocôndrias, que abastecem energeticamente o seguimento externo, região onde se concentra o pigmento visual responsável pela captação do estímulo luminoso.

3) A membrana limitante externa (MLE) é um aspecto de microscopia óptica dado pelo alinhamento de múltiplas *zonulae adherentes* que, mais freqüentemente, unem segmentos internos de cones e bastonetes à porção mais

posterior das células de Müller, também unem células de Müller a células de Müller e, mais raramente, fotorreceptor a fotorreceptor (COHEN, 1965).

4) A camada nuclear externa (CNE) é formada pelos núcleos dos fotorreceptores.

5) A camada plexiforme externa (CPE) é composta de sinapses entre os axônios dos cones e dos bastonetes com os dendritos das células bipolares, horizontais e amácrinas.

6) A camada nuclear interna (CNI) contém os corpos celulares das células bipolares, células horizontais, células amácrinas e células de Müller. As células amácrinas e horizontais possuem longas terminações (dendritos e axônios) para contato com outras células, visando a associação do estímulo elétrico, proveniente dos fotorreceptores. As células bipolares representam os neurônios de primeira ordem no sistema de condução do estímulo luminoso e as células de Muller têm função de nutrição e suporte estrutural. Não há estratificação da camada em relação aos tipos celulares acima, com exceção das células horizontais que, geralmente, se encontram na subcamada mais externa, adjacente á camada plexiforme externa (BOYCOTT & DOWLING, 1969). Observe-se que, nos coelhos, a retina contém também as células gigantes com nucléolo, não encontradas em retina humana (PRINCE et al., 1964).

7) A camada plexiforme interna (CPI) formada, principalmente, pelos axônios das células bipolares e dendritos das células ganglionares. Corresponde à área de sinapses entre as células bipolares, amácrinas e horizontais com as células ganglionares.

8) A camada ganglionar (CG) é aquela que contém os corpos das células ganglionares, que representam os neurônios de segunda ordem das vias ópticas. Em coelhos da raça Nova Zelândia, são encontradas as células ganglionares gigantes, medindo de 27 a 30 μ de diâmetro.

9) A camada de fibras nervosas (CFN) é constituída por axônios das células ganglionares, cercados de prolongamentos das células de Müller, as quais têm papel nutritivo e de suporte para o tecido retiniano. Os axônios das células ganglionares são fibras amielínicas distribuídas em feixes que se estendem paralelamente à superfície da retina e convergem na região papilar, formando o nervo óptico. Diferente da retina humana, a do coelho tem com as fibras mielinizadas ao longo dos raios medulares.

10) A membrana limitante interna (MLI), situada entre a retina e o vítreo, representa o limite interno da retina.

A observação fundoscópica da retina do coelho, diferente da humana, demonstra que a cabeça do nervo óptico situa-se no terço superior da retina, da qual partem, nasal e temporalmente, duas faixas brancas de fibras nervosas e vasos, denominadas de raios medulares (PRINCE et al., 1964).

Em relação ao suprimento sanguíneo retiniano, a retina humana é suprida, basicamente, por duas redes capilares: os vasos retinianos (a artéria central da retina e seus ramos), que estão localizados na retina interna e fornecem circulação para os dois terços internos da retina e a coriocapilar (sistema capilar de artérias da coróide, ramo das artérias ciliares), que fornece as necessidades metabólicas da retina externa, avascular. Ocasionalmente,

uma artéria ciliarretiniana, ramo da circulação ciliar, irá fornecer circulação para a porção da retina interna entre o nervo óptico e o centro da mácula, feixe papilomacular (HOGAN et al., 1971). A artéria retiniana se divide em um ou mais ramos nasais e temporais, que saem do centro do disco. As veias mostram padrão macroscópico semelhante. Os vasos retinianos dos coelhos formam uma rede capilar radial seguindo as ramificações das células ganglionares, partindo do nervo óptico em direção à periferia, ao longo dos raios medulares, conforme descrito anteriormente (PRINCE et al., 1964).

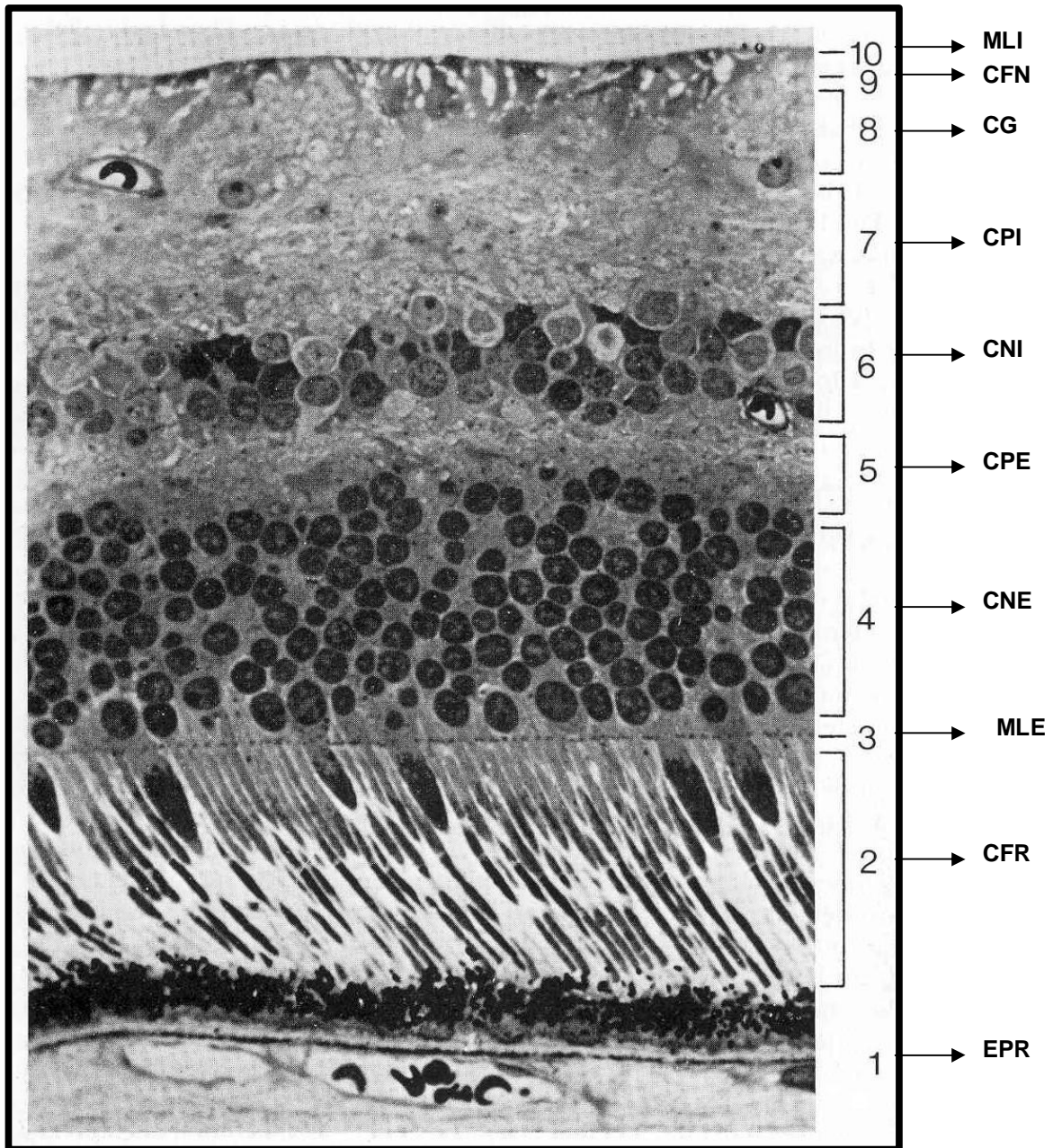


Figura 1. Estrutura microscópica da retina, ilustrando suas 10 camadas. EPR - epitêlio pigmentado da retina; CFR - camada de fotorreceptores; MLE - membrana limitante externa; CNE - camada nuclear externa; CPE - camada plexiforme externa; CNI - camada nuclear interna; CPI - camada plexiforme interna; CG - camada de células ganglionares; CFN - camada de fibras nervosas; MLI - membrana limitante interna (adaptado de HOGAN et al., 1971).

1.2 ANGIOGÊNESE

A formação de vasos sanguíneos envolve dois processos fundamentais: vasculogênese e angiogênese.

A vasculogênese é a formação primária de vasos sanguíneos a partir dos precursores da célula endotelial, os angioblastos, durante o desenvolvimento embrionário. É caracterizada pela diferenciação e proliferação dos angioblastos, que se organizam numa rede vascular primitiva, denominada plexo capilar primário, a partir do qual novos brotos capilares podem germinar, constituindo a base do processo angiogênico (CONWAY et al., 2001).

A angiogênese é definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes, podendo ocorrer por brotamento ou por intussuscepção, em um processo no qual os vasos são progressivamente remodelados para um sistema circulatório adulto funcional (RISAU, 1997). Pode ser fisiológica ou patológica. A angiogênese normal ocorre, mormente, durante o desenvolvimento embrionário. É observada, porém, também ao longo da vida adulta, em alguns eventos fisiológicos, sendo essencial para o processo de reprodução, desenvolvimento e reparação. Nestas condições, é ativada por um curto período, sendo, a seguir, completamente inibida (CAMPOCHIARO, 2000).

O controle da angiogênese é feito por um delicado balanço entre fatores endógenos promotores e inibidores. Assim sendo, quando os fatores promotores predominam, a célula endotelial é ativada, proliferando e migrando. Em contrapartida, quando prevalecem os inibidores, a célula endotelial retorna ao estado quiescente, assim, mantendo-se. A ativação da célula endotelial pode envolver tanto a indução de um fator promotor quanto à perda de um inibidor.

São exemplos de promotores: VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), FGF2 (*Basic Fibroblast Growth Factor*), angiopoietinas, ICAM 1 (*Intracellular Adhesion Molecule*) e de inibidores: PEDF (*Pigment Epithelial-Derived Factor*), Tryptophanyl-tRNA synthetase, *interferon alpha* e Trombospodina 1 (DORREL et al., 2007; FOLKMAN, D'AMORE, 1996; FOLKMAN, KLAGSBRUN, 1987).

A angiogênese constitui, portanto, complexo processo que inclui mediadores solúveis, interações entre células e da célula com a matriz extracelular, bem como forças biomecânicas. Compreende diversas etapas que, de forma simplificada, podem ser assim descritas: a) aumento da permeabilidade vascular e deposição de fibrina extravascular; b) desarranjo da parede vascular, com remoção dos pericitos; c) degradação da membrana basal e da matriz extracelular; d) migração da célula endotelial, através da matriz extracelular remodelada; e) proliferação da célula endotelial; f) formação de estruturas tubulares; g) inibição da proliferação e migração da célula endotelial; h) reconstituição da membrana basal; i) maturação dos complexos juncionais; j) construção da parede vascular, através do recrutamento e diferenciação de células murais - pericitos e células de músculo liso e, finalmente, estabelecimento de fluxo sanguíneo no novo vaso (BATTEGAY, 1995; CONWAY et al., 2001; PEPPER, 1997; RISAU, 1997).

O sistema vascular retiniano começa no nervo óptico e se estende radialmente em direção às porções periféricas da retina (GARIANO, GARDNER, 2005). Vasos da camada superficial retiniana proliferam e invadem a retina interna para formar a rede capilar profunda, através da angiogênese por

brotamento, que é o mecanismo predominante de vascularização na retina assim como no cérebro, embora a intussuscepção não esteja excluída (GARIANO, GARDNER, 2005). Uma vez formadas as redes vasculares, essas são remodeladas, baseadas na tensão parcial de oxigênio tecidual (ASHTON, 1957), envolvendo genes regulados pela hipóxia, podendo resultar em regressão vascular, na formação de colaterais ou em neovascularização, como na retinopatia da prematuridade (CHEN, SMITH, 2007).

1.2.1 Angiogênese patológica

Quando os mecanismos de controle são insuficientes, a angiogênese, seja excessiva ou deficiente, torna-se patológica, dando origem, então, às chamadas doenças angiogênese-dependentes. Dentre os processos associados à angiogênese patológica, pode-se citar o crescimento tumoral, artrite reumatóide, formas de retinopatia (STEPHAN, BROCK, 1996), como a retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, retinopatia da prematuridade e oclusão venosa retiniana, glaucoma neovascular e neovascularização corneana. Outras doenças decorrem, por outro lado, da angiogênese insuficiente. Dentre elas: úlceras cutâneas crônicas, isquemia cerebral, miocárdica e periférica (BAUER et al., 2005; HAYASHI et al., 2006; WANG et al., 2006).

A arquitetura única da retina permite identificar dois tipos de neovascularização: a neovascularização retiniana, que usualmente penetra na MLI e progride em direção ao vítreo, embora possa penetrar a retina avascular

externa até o espaço sub-retiniano (YANNUZZI et al., 2001); e a neovascularização coróideo, que penetra na membrana de Bruch e cresce em direção ao espaço sub-retiniano. Várias observações clínicas e experimentais têm indicado que a isquemia, com conseqüente hipóxia, é o estímulo inicial para a neovascularização retiniana (MICHAELSON, 1948; ASHTON, 1957), por causar a liberação de fatores angiogênicos (CAMPOCHIARO, 2000; DAS, McGUIRE, 2003).

Assim sendo, grande esforço tem sido empregado no intuito de desvendar os mecanismos envolvidos no processo angiogênico, bem como para a descoberta de drogas que tenham como alvo tais mecanismos, e que possam ser incorporadas ao arsenal terapêutico das doenças angiogênese-dependentes (CAMPOCHIARO, 2000).

1.2.2 Fatores angiogênicos

Conforme anteriormente mencionado, hipóteses iniciais postularam que o desenvolvimento da neovascularização retiniana é estimulado por um ou mais fatores angiogênicos liberados pela retina isquêmica (MICHAELSON, 1948; ASHTON et al., 1954; WISE, 1956). Na cascata angiogênica retiniana, a hipóxia é o estímulo inicial que causa a liberação dos fatores de crescimento, integrinas e proteinases, o que resulta na proliferação celular endotelial, migração e formação de tubo, passos críticos do processo angiogênico (AUSPRUNK, FOLKMAN, 1977).

A indução da angiogênese foi inicialmente atribuída ao fator de crescimento fibroblástico (FGF) ácido ou básico. Subseqüentemente, muitas outras moléculas foram identificadas como angiogênicas, incluindo: fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), angiogenina, angiotropina, angiopoietinas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), trombospondina, proteína quinase C fração β (PKC- β), peptídeos vasoativos, tais como a angiotensina II, e moléculas de adesão, tais como as integrinas (FOLKMAN, D'AMORE, 1996; FOLKMAN, KLAGSBRUN, 1987), Portanto, vários fatores estão envolvidos neste processo, sendo implicados na neovascularização em diversas doenças retinianas isquêmicas, a exemplo da retinopatia diabética, na qual o VEGF é o principal fator angiogênico (CONNOLY et al., 1989; SHWEIKI et al., 1992; SHWEIKI et al., 1993).

As angiopoietinas (Ang-1 a Ang-4) têm sido apresentadas como fatores de crescimento específicos para células endoteliais, agindo como associados importantes do VEGF. Elas se ligam a receptores transmembrânicos, tipo tirosina quinase, chamados Tie2, restritos às células endoteliais. Porém, enquanto as Ang-1 e Ang-4 foram identificadas como ativadores destes receptores, Ang-2 e Ang-3 parecem inibir sua atividade (TSIGKOS et al., 2003).

A família dos FGFs compreende 22 membros de estrutura homóloga, apresentando-se como pequenos polipeptídeos com cerca de 18 KDa, não glicosilados, com núcleo central contendo 140 aminoácidos. FGF1 (ácido) e

FGF2 (básico) estão preferencialmente implicados no processo da angiogênese. Eles transmitem seus sinais através de 4 receptores de FGF de alta afinidade, proteínas quinases transmembrânicas (FGFR-1 ao FGFR-4), as quais se ligam à FGFs distintos com diferentes afinidades. Essas moléculas atuam como reservatório para fatores pró-angiogênicos e são sintetizadas por uma variedade de tipos celulares, incluindo células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos da derme, promovendo a proliferação e diferenciação celular (PRESTA et al., 2005).

O TGF- β é um dos mais importantes moduladores da angiogênese, apresentando-se em três isoformas nos mamíferos (TGF- β 1, 2 e 3). Essas isoformas alcançam suas ações biológicas por meio de ligação a receptores de superfície (TGF- β Rs), designados tipos I, II e III, sendo estimuladores da mitose ou inibidores da proliferação (PEPPER, 1997).

Os IGF-I e II são potentes estimuladores da mitose e têm efeito benéfico no processo da cicatrização. O IGF-I também aumenta a expressão do mRNA VEGF e a produção do VEGF em osteoblastos (GOAD et al., 1996) e em linhas celulares do carcinoma de cólon (WARREN et al., 1996). Além disso, níveis elevados de IGF-I são encontrados no vítreo de pacientes com retinopatia diabética proliferativa (PFEIFFER et al., 1997).

O PDGF, que compreende uma família de proteínas homo ou heterodiméricas, foi o primeiro fator de crescimento a se apresentar como quimiotático de células inflamatórias e promotor de proliferação celular (TALLQUIST, KAZLAUKAS, 2004).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos agentes angiogênicos mais amplamente estudados, tendo papel essencial no desenvolvimento vascular, angiogênese e linfangiogênese (IKEDA et al., 2006). A identificação, caracterização e purificação do VEGF, em 1989, por Leung et al, contribuíram para o entendimento da regulação da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo na angiogênese.

1.2.3 Fator de crescimento vasoendotelial (VEGF)

O VEGF, glicoproteína de 45-KDa, é um mitógeno celular endotelial angiogênico *in vivo* e potente indutor de permeabilidade microvascular (CONNOLLY et al., 1989; DVORAK et al., 1995). A família dos fatores de crescimento endotelial inclui o fator de crescimento placentário (PIGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o homólogo do VEGF viral VEGF-E (WITMER et al., 2003; WERNER, GROSE, 2003). Nos humanos, quatro isoformas de VEGF-A foram identificadas, com variação no número de aminoácidos, sendo elas os VEGF 121, 165, 189 e 206 (WITMER et al, 2003), as quais possuem atividades biológicas similares, mas diferem em suas propriedades de ligação ao heparan-sulfato e à matriz extracelular.

Muitos tipos celulares são capazes de produzir VEGF, como os fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e queratinócitos. Na retina, o VEGF tem sua expressão aumentada pela hipóxia em células gliais, como células de Müller e astrócitos de retinas de ratos (SUEISHI et al., 1996), e em pericitos,

células endoteliais e células do EPR humanas cultivadas (SHIMA et al., 1995; AIELLO et al., 1995). Em pacientes diabéticos, o VEGF foi identificado nas células de Müller e células gliais na porção anterior do nervo óptico (AMIN et al., 1997). Fibroblastos da coróide também podem apresentar expressão do RNA mensageiro do VEGF aumentada, secundária à estimulação parácrina (KVANTA, 1995).

As isoformas do VEGF A são geradas por *splicing* alternativo do RNA mensageiro (PLATE, WARNKE, 1997). As formas mais longas (com maior número de aminoácidos: 189 e 206) encontram-se ligadas à matriz extracelular e as mais curtas (isoformas 121, 165) são livremente difusíveis. VEGF-A está envolvido nos processos de aumento da permeabilidade vascular e angiogênese, sendo 5 000 vezes mais potente que a histamina (SENGER et al., 1990). VEGF-B está envolvido na progressão de tumores por mecanismos não angiogênicos, como a proteólise (Gunningham et al., 2001), enquanto que VEGF-C e VEGF-D estão envolvidos na angiogênese e linfangiogênese também de tumores. Segundo Namiecinska et al. (2005), os VEGF A e B têm maior participação na angiogênese, enquanto os VEGF C e D, na linfangiogênese. O VEGF A age também aumentando a permeabilidade vascular. Além de sua ação como fator chave na angiogênese, o VEGF-A também possui atividade neurotrófica e neuroprotetora, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico (NAMIECINSKA et al., 2005). O VEGF E descrito mais recentemente também é potente fator angiogênico (MEYER et al., 1999).

Três receptores tirosinaquinase, KDR (VEGFR-2), Flt-1 (VEGFR-1) e Flt-4 (VEGFR-3), modulam a atividade do VEGF, enquanto dois outros receptores sem atividade tirosinaquinase, as neuropilinas, também são importantes sítios de ligação do VEGF (CAMPOCHIARO, 2004). O VEGFR-1 é receptor para os VEGF A e B, o VEGFR-2 para VEGF A, C, D e E, e o VEGFR-3 é receptor para os VEGF C e D (WITMER et al., 2003). Em processos patológicos, a produção de VEGF e seus receptores está relacionada à hipóxia tecidual, compartilhando possivelmente um fator comum, HIF (fator induzido pela hipóxia), que se acumula quando há baixo teor de oxigênio e desencadeia a ativação de grande número de genes, inclusive o responsável pelo VEGF (ARJAMAA, NIKINMAA, 2006). A hipóxia estimula a expressão do mRNA VEGF-A (SHWEIKI et al., 1992), enquanto os mRNA VEGF C e VEGF D têm sua expressão diminuída (IKEDA et al., 2006). O aumento do VEGF A resulta em estímulo à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, proliferação das células endoteliais e ativação das metaloproteinases que lisam a matriz extracelular, deixando espaço para o crescimento de um novo vaso (OLIVEIRA et al., 2002).

1.3 MODELOS DE NEOVASCULARIZAÇÃO

Com o objetivo de melhor esclarecer a patogênese das doenças proliferativas intra-oculares e dos mecanismos da angiogênese, vários modelos experimentais de neovascularização ocular foram criados ao longo dos últimos anos, descritos abaixo.

O modelo mais utilizado em animais foi o da microbolsa corneana, em que a neovascularização da córnea é induzida por implantes inseridos em uma bolsa estromal corneana, próxima ao limbo, contendo estimulantes da angiogênese, como fatores de crescimento (bFGF e VEGF) e a endotoxina (MUTHUKKARUPPAN, AUERBACH, 1979; FOURNIER et al., 1981). Este modelo é considerado um dos melhores ensaios *in vivo*, uma vez que a córnea é uma estrutura avascular, transparente e de fácil acesso e observação, de modo que qualquer vaso sangüíneo que cresça no seu interior decorreria do estímulo angiogênico utilizado.

Um modelo de neovascularização retiniana e de vitreo-retinopatia, simulando retinopatias isquêmicas, tais como a retinopatia diabética, foi desenvolvido em coelhos usando injeção intravítrea de fibroblastos cultivados (TANO et al., 1981). Este modelo foi modificado por ANNE HANNEKAN (1993) ao utilizar fibroblastos expressando bFGF. ANTOSZYK et al. (1993) remodelaram-no, utilizando hialuronidase intravítrea, demonstrando que a triancinolona intravítrea reduz a taxa e a severidade da neovascularização nesse modelo. Miller et al. (1994) e Tolentino et al. (1995) observaram que quantidades elevadas de VEGF em primatas e em coelhos resultou em neovascularização de íris e de retina. Em 1997, OZAKI et al. utilizaram implantes intravítreos de PLGA, formando um sistema de liberação lenta do VEGF na cavidade vítrea, que levaram ao desenvolvimento de neovasos de retina de coelhos em 21 dias, também induzindo a quebra da barreira hematorretiniana nas fases mais precoces (menos de 3 dias após o implante),

com aumento da permeabilidade vascular. OKAMOTO et al. (1997) desenvolveram um modelo de neovascularização retiniana e subretiniana, tanto útil, quanto interessante, utilizando animais transgênicos com expressão de VEGF, demonstrando que esta era suficiente para causar angiogênese. O estudo de NADIR ALIKACEM et al. (2000) mostrou que a presença de neovasos também ocorreu no final da 2ª semana, após o implante intravítreo, estando de acordo com os resultados demonstrados por Ozaki. Estes dados são similares aos dos estudos sobre a retinopatia diabética proliferativa (BOULTON et al., 1998; MATHEWS et al., 1997; VINOES et al., 1997).

Modelos animais de retinopatia da prematuridade (ROP) foram investigados na década de 50, quando surgiu a epidemia de ROP. Vários modelos foram desenvolvidos em ratos e camundongos, com melhor reprodutibilidade, bem como em gatos e cachorros. O ambiente hiperóxico tanto inibe o desenvolvimento, quanto promove o fechamento dos vasos sanguíneos retinianos. Quando os animais retornam ao meio-ambiente, a combinação de oxigênio inspirado em baixa tensão com vasos retinianos em desenvolvimento resulta em retinopatia isquêmica e neovascularização retiniana (PENN et al., 1993; REYNAUD, 1994; SMITH et al., 1994).

Nos estudos das oclusões venosas retinianas, vários experimentos foram criados, nas décadas de 60 e 70, através da diatermia ou fotocoagulação em porcos, gatos e macacos, como modelo para doenças vasculares retinianas em humanos. Neovascularização de retina, de íris e de disco foram observadas (KOHNER et al., 1970; HAMILTON et al., 1975 e 1979). POURNARAS et al.

(1990) e DANNIS et al. (1993) observaram neovascularização retiniana após a indução de oclusão venosa por fotocoagulação a laser em porcos. TAMURA (2001) utilizou um modelo experimental em coelhos para investigar as mudanças histopatológicas em oclusões venosas, através da aplicação de trombina na parede da veia retiniana, chamado modelo de Hirosaki.

Neovascularização de coróide têm sido induzida experimentalmente em várias espécies, como demonstrado em estudos de KIMURA et al. (1995, 1999).

Porém, todos os modelos descritos previamente têm limitações. O modelo ideal utilizaria um animal pequeno, com neovascularização de retina e/ou coróide que ocorresse em resposta a um estímulo significativo, tal como o VEGF. A neovascularização no modelo animal deveria reproduzir muitos dos achados da doença clínica, tais como o extravasamento de fluoresceína na angiografia e achados histopatológicos característicos (MILLER, 1997).

1.4 DOENÇAS VASCULARES DA RETINA

As doenças que cursam com neovascularização ocular, por seu caráter crônico e progressivo e por serem relativamente de difícil controle, são uma das principais causas de cegueira da humanidade. Dentre elas, destacam-se a retinopatia diabética, oclusões venosas retinianas (oclusão de veia central da retina e oclusões de ramo da veia central da retina), retinopatia da prematuridade e degeneração macular relacionada à idade (MILLER, 1997). A patogênese em comum das doenças vasculares da retina é o comprometimento do suprimento sanguíneo do tecido retiniano, levando à isquemia do mesmo.

Como comentado acima, a isquemia induz a produção de diversos fatores, dentre eles o VEGF e, conseqüentemente, estimula a angiogênese. Novos vasos surgem na retina e, pelas características imaturas de suas paredes, podem sangrar, perder líquido, proteína e gorduras pelas suas paredes, e levar a hemorragias e acúmulo desses constituintes sanguíneos nas estruturas adjacentes. As células sofrem com a isquemia e alteração do interstício da retina, culminado com a apoptose ou necrose das mesmas (MARTIN et al., 2004). Os neovasos de retina podem crescer sobre o vítreo, formando pontes fibrovasculares que, posteriormente, podem contrair e ocasionar hemorragias e descolamento de retina tracional, caracterizando estágios avançados das retinopatias vasculares (AIELLO et al., 1998; GARNER, 1981; KOHNER, 1993; PORTA, BANDELLO, 2002).

A retinopatia diabética (RD) é a causa mais freqüente de cegueira em indivíduos entre 20 e 60 anos. É uma microangiopatia que se caracteriza pelo espessamento da membrana basal, perda de pericitos, formação de microaneurismas e fechamento capilar, que resultam em isquemia da retina e hipóxia. Esta última, principalmente, estimula a liberação de fatores angiogênicos que promovem a formação de neovasos retinianos (figura 2), que se estendem ao longo das arcadas vasculares ou crescem para o vítreo, e podem evoluir para hemorragia vítrea, descolamento de retina tracional, neovasos de íris ou glaucoma neovascular (GARNER, 1981; BOULTON et al., 1998). Embora vários fatores estejam envolvidos neste processo, como o bFGF, o PDGF e o IGF-1, evidências recentes têm apontado o VEGF como o principal

mediador da retinopatia diabética proliferativa (RDP). Níveis elevados de VEGF na retina e na cavidade vítrea têm sido demonstrados em pacientes com retinopatia diabética, em maior quantidade naqueles com RDP (ADAMIS et al., 1994; MALECAZE et al., 1994; AIELLO et al., 1994; BOULTON et al., 1998), bem como em modelos animais de NV ocular (MILLER et al., 1994). O papel do VEGF na retinopatia, tanto *background* como pré-proliferativa, parece estar relacionado à modificação da permeabilidade vascular, então aumentada, que teria, assim, importância na progressão da neovascularização retiniana. Injeções intravítreas de VEGF em animais normais induziram processo patológico semelhante à retinopatia diabética, com a formação de neovasos de íris e de retina, bem como o aumento da permeabilidade vascular (TOLENTINO et al., 1996 e 2002; OZAKI et al., 1997). Da mesma forma, AIELLO et al. (1994) demonstraram níveis reduzidos de VEGF na cavidade vítrea de pacientes após terapia de fotocoagulação, provavelmente por redução da isquemia, o que culmina com a regressão da doença. Angiogênese e *leakage* vascular são dois importantes eventos para o início da RDP. Observou-se ainda que, em modelos animais, o bloqueio de VEGF está associado à inibição da neovascularização de íris e à supressão da formação de neovasos retinianos (AIELLO et al., 1995; ADAMIS et al., 1996). Recentemente, inibidores de VEGF têm sido desenvolvidos, através de injeções intravítreas, bloqueando ou diminuindo a sua quantidade, com conseqüente regressão do edema e dos neovasos em doenças vasculares retinianas associadas à formação de neovasos, como na retinopatia

diabética (CUNNINGHAM et al., 2005; ROSENFELD et al., 2005; ADAMIS et al., 2006; SPAIDE, FISHER, 2006).

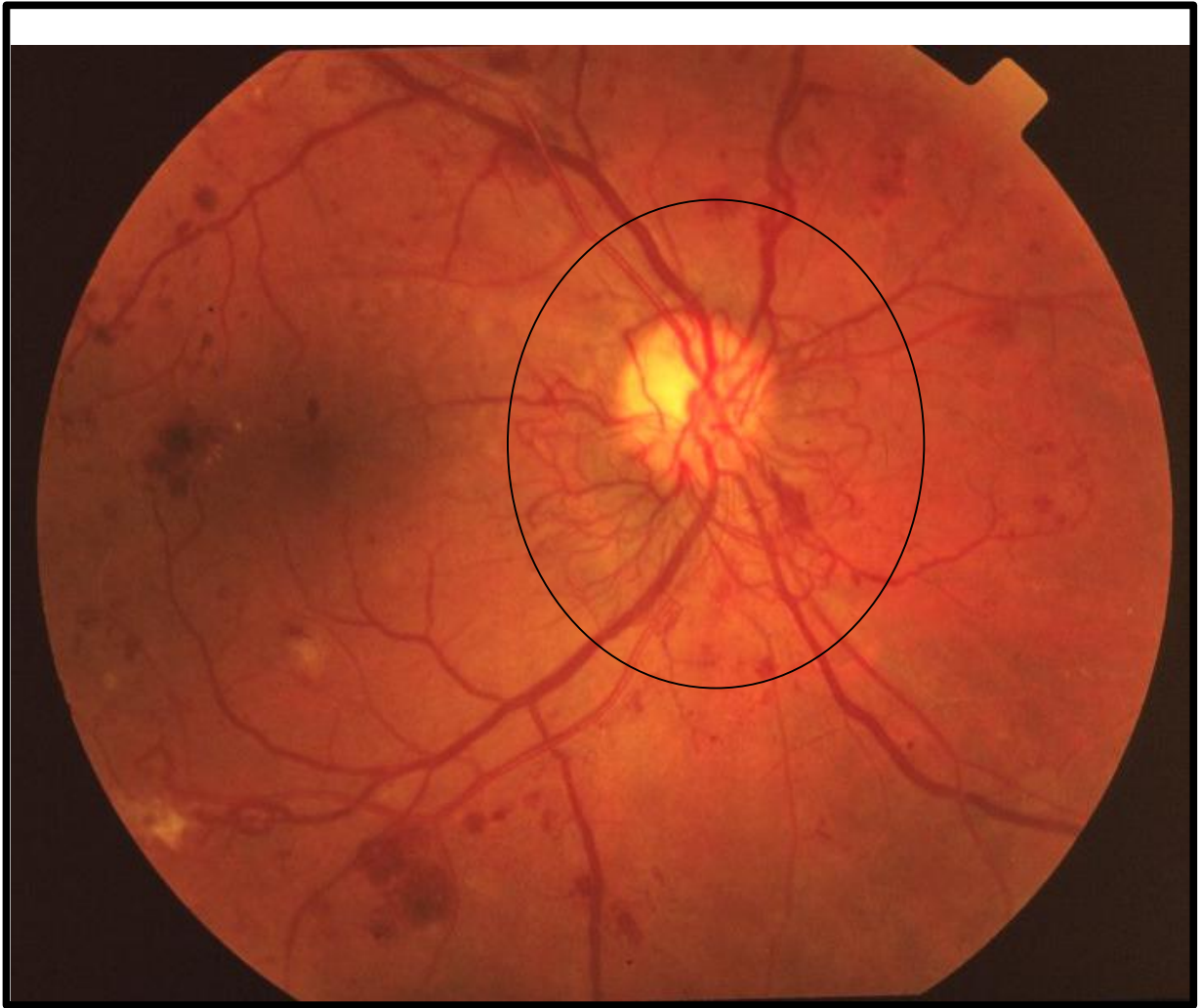


Figura 2 - Retinografia demonstrando neovasos retinianos (em destaque) em paciente com retinopatia diabética (figura doada pelo Prof. Dr. Rodrigo Jorge).

As oclusões venosas são consideradas a segunda maior causa de doença vascular retiniana, após a retinopatia diabética, sendo que nas formas isquêmicas 30 a 50% dos olhos evoluem também com neovascularização de retina, associada a importantes áreas de não-perfusão capilar, o que pode levar a hemorragias vítreas recorrentes e descolamento tracional da retina. A patogênese das oclusões venosas está relacionada à alteração da crase sanguínea e à trombose venular por estase, bem como às alterações crônicas da parede vascular. Muitas vezes, são acompanhadas de edema macular persistente, isquemia, perda de pericitos e células endoteliais, inclusive com a produção de fatores endoteliais de crescimento vascular (VEGF) e a formação de neovasos, levando a uma doença progressiva de impossível resolução espontânea (HAMILTON et al., 1975 e 1979; AIELLO, 1997).

A retinopatia da prematuridade (ROP) é uma doença vasoproliferativa da retina observada em recém-nascidos prematuros, relacionada à imaturidade retiniana, com períodos de hiperóxia e hipóxia, sendo que esta última leva à indução da síntese do VEGF e conseqüente progressão para a neovascularização retiniana. Há evidências de que concentrações excessivas de O₂ na fase de desenvolvimento vascular retiniano levam à injúria das células endoteliais recém-diferenciadas, o que provocaria uma obliteração destes capilares, parando o desenvolvimento vascular da retina. Nas porções periféricas da retina ocorre então hipóxia, que leva à liberação de fatores angiogênicos, como o VEGF, substância, de fato, encontrada em quantidade

aumentada na ROP (FLYNN et al., 1987; PROST, 1988, LASHKARIK et al., 2000).

Na degeneração macular relacionada à idade (DMRI), principal responsável por baixa visual severa em pessoas acima de 65 anos, os neovasos originam-se da coriocapilar e invadem o espaço subretiniano macular, produzindo descolamento exsudativo localizado, com hemorragia, levando à fibrose e perda de fotorreceptores, com conseqüente prejuízo para a visão central (MILLER, 1997).

Apesar de diferentes, em suas fisiopatologias, cursos naturais e formas de apresentação, a retinopatia diabética, as oclusões venosas retinianas, a ROP e a DMRI têm em comum o VEGF como estímulo para a angiogênese e o surgimento de vasos neoformados patológicos (MILLER, 1997). Assim sendo, um grande esforço tem sido empregado no intuito de desvendar os mecanismos envolvidos neste processo angiogênico, bem como descobrir drogas que tenham como alvo tais mecanismos, e que possam ser incorporadas ao arsenal terapêutico das doenças angiogênese-dependentes.

1.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA

Vários estudos demonstraram que a indução de NV retiniana requer quantidades elevadas de VEGF, com liberação contínua na cavidade vítrea. Em 1994, MILLER et al. observou uma relação temporal e espacial entre o fator angiogênico secretado (VEGF) e o aumento da permeabilidade vascular e o desenvolvimento de neovascularização ocular *in vivo*, após oclusão venosa com

laser, através da medição dos níveis de VEGF no vítreo. Isso demonstrava que os níveis do fator angiogênico estão relacionados com a extensão da neovascularização no decorrer do tempo. No trabalho de TOLENTINO et al. (1995), a injeção intravítrea de VEGF em primatas resultou em neovascularização de íris, mas não causou neovascularização retiniana, só observada após injeções repetidas de VEGF. Em 1997, OZAKI et al. utilizou implantes intravítreos de liberação lenta do VEGF dentro da cavidade vítrea, fato que levou ao desenvolvimento de neovasos de retina de coelhos em 21 dias e induziu à quebra da barreira hematorretiniana nas fases mais precoces, menos de 3 dias após o implante, com aumento da permeabilidade vascular, dados confirmados pelo estudo de ALIKACEM, 2000. Sendo assim, recentemente foram desenvolvidos estudos utilizando sistemas de liberação lenta tanto capazes de promover a liberação prolongada do fator no interior do olho, quanto de manter a concentração do mesmo no nível adequado para a promoção da NV ocular (COLTHURST et al., 2000; KIMURA; OGURA, 2001; YASUKAWA et al., 2001). Estes sistemas devem ser compatíveis com o organismo; os componentes nele presentes devem ser quimicamente inertes, não-carcinogênicos, hipo-alergênicos, mecanicamente estáveis e não causador de resposta inflamatória no local da aplicação (ATHANASIOU, 1996). Acrescente-se que as características químicas e físicas do material não devem ser modificadas pelo tecido local. Podem ser implantados na região subconjuntival, na esclera, na câmara anterior e na cavidade vítrea (KIMURA; OGURA 2001).

Os sistemas são preparados a partir de diferentes polímeros, que podem ser biodegradáveis ou não-biodegradáveis. Os polímeros biodegradáveis podem ser naturais ou sintéticos. Os naturais, à base de proteínas como as albuminas bovina e humana, o colágeno e a gelatina, apresentam uso restrito por conterem pureza questionável e, em alguns casos, atividade antigênica marcante. Os sintéticos, representados por poliamidas, poliaminoácidos, polialquilcianacrilatos, poliésteres, poliuretanos e poliacrilamidas, têm despertado crescente interesse para a sua aplicação como sistemas de liberação lenta de drogas ou substâncias (JAIN et al., 1998). Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a poli (caprolactona), o poli (D,L-lático) (PLA) e os copolímeros derivados dos ácidos lático e glicólico (PLGA), sendo que os dois últimos tipos têm sido amplamente empregados. A biodegradação desses polímeros ocorre por erosão, através de clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando os ácidos lático e glicólico. Esses ácidos, por serem metabólitos naturais do organismo, são eliminados pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico e água (ATHANASIOU et al., 1996). O seu tempo de degradação pode variar de acordo com a área superficial, a porosidade e a massa molecular do sistema, cujas propriedades estão descritas no trabalho de LEWIS (1990). Sua preparação em ambientes assépticos torna-se o método mais seguro e eficaz. Os polímeros não-biodegradáveis são representados pelos derivados de celulose, silicones, polímeros acrílicos, polivinilpirrolidona e co-polímeros dos óxidos de etileno e propileno; necessitam

de remoção após o término de liberação da droga, pois não são metabolizados ou degradados pelo organismo.

Vários sistemas de liberação lenta têm sido propostos, incluindo lipossomos, nanopartículas biodegradáveis, implantes e microesferas (PEYMAN; GANIBAN, 1995). Os lipossomos, vesículas formadas por fosfolipídios circundando um compartimento aquoso, têm sido usados como veículo para a liberação lenta de substâncias através de preparações tópicas, subconjuntivais e intravítreas. As desvantagens dos lipossomos, quando comparados às microesferas, são sua vida útil mais curta e seu maior custo de fabricação, além da dificuldade de preparo e baixa estabilidade, o que impede a sua liberação por períodos muito prolongados (TREMBLAY et al., 1985). Os implantes apresentam-se de diferentes formas, moldados na forma de discos, cilindros, lâminas, bastões ou *plugs*. Eles podem ser produzidos de forma que a droga se encontre dispersa homogeneamente na matriz polimérica, o sistema matricial, ou contida em um núcleo envolto por uma camada polimérica semipermeável, o sistema tipo reservatório. Suas principais vantagens em relação aos outros métodos de liberação lenta para o interior do olho são a sua praticidade e o fato de não interferirem na transparência dos meios oculares, principalmente quando colocados na cavidade vítrea (YASUKAWA et al., 2004). Sua desvantagem é a necessidade do método cirúrgico para a sua colocação. As microesferas, de tamanho maior que 1 μ m, podem ser preparadas a partir dos polímeros biodegradáveis derivados dos ácidos láctico (PLA) e dos co-polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico (PLGA), sendo compostas por uma matriz polimérica

contendo a substância. Sua degradação ocorre por hidrólise e a taxa de liberação da substância incorporada pode ser alterada com a variação dos polímeros e da sua proporção em caso de co-polimerização e aumento do peso molecular. Têm sido usadas como sistema injetável de liberação lenta não só para o uso ocular assim como em vários campos da medicina, como câncer de próstata, endometriose e outras doenças hormônio-dependentes (WADA et al., 1990; MORITERA et al., 1991; 1992). Todavia, têm como desvantagem o fato de permanecerem em suspensão no vítreo após a injeção, dificultando o exame oftalmológico até a sua degradação (MORITERA et al., 1991 e 1992).

KIMURA et al (1994) desenvolveram dois implantes biodegradáveis à base de D,L-PLA, com polímeros de peso molecular diferente, com o intuito de avaliar o perfil de liberação *in vitro* e a cinética *in vivo* do marcador, após implantação intravítrea. Concentrações detectáveis do marcador foram encontrados no vítreo de coelhos após 17 dias (implante 1) e 28 dias (implante 2). Os 2 sistemas apresentaram boa tolerância, sem evidência de efeito tóxico e inflamação significativa (KIMURA et al., 1994). Em outros trabalhos, utilizando composto de PLGA, observaram-se dados semelhantes (HASHIZOE et al., 1994; RUBSAMEN et al., 1994). A partir dos resultados obtidos, os pesquisadores acreditam que sistemas constituídos por polímeros biodegradáveis sejam bastante promissores no que diz respeito à liberação prolongada de substâncias no vítreo (FIALHO, 2003).

No presente estudo, para o desenvolvimento do modelo experimental de neovascularização retiniana em coelhos, utilizamos como sistema de liberação lenta da fração angiogênica do látex as microesferas de PLGA.

1.6 FRAÇÃO ANGIOGÊNICA DERIVADA DO LÁTEX

Desde 1994 vem sendo pesquisado, com sucesso, o desenvolvimento de um novo material biocompatível, à base de látex natural, extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, desenvolvido no laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo/Brasil. Em trabalhos realizados por MRUÉ (1996-2000), evidenciou-se que este material é um importante indutor de cicatrização de paredes esofágicas lesadas em cães, experimentalmente, além de produzir um acentuado aumento na vascularização, a neoangiogênese. A biocompatibilidade da biomembrana do látex, extraída da seringueira *Hevea brasiliensis*, foi demonstrada através de implantes *in vivo* em cães (LCHAT et al., 1997; MRUÉ, 2001). A caracterização biológica da fração angiogênica do látex, de natureza protéica, foi tese de dissertação de Mestrado em Bioquímica pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo/Brasil em 2004 (MENDONÇA). Nesse trabalho, foi possível identificar e purificar a composição do material ativo, quanto à capacidade de aumento da permeabilidade vascular e à indução de angiogênese *in vivo*.

O material foi estudado, quanto à sua atividade angiogênica, através do teste da membrana corio-alantóidea (MCA), que quantifica a angiogênese induzida pelo material diretamente na MCA de embriões de galinha, conforme descrito por WILTING et al, em 1991. Neste estudo, verificou-se que a fração 1, denominada de FAL, foi a mais angiogênica, a qual foi utilizada no presente trabalho.

1.7 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Existem vários modelos de neovascularização de retina que empregam como estímulo angiogênico intervenções como laser, ou drogas como o VEGF. Os modelos baseados em intervenções geralmente são complexos e caros, pela necessidade da intervenção cirúrgica, enquanto que os modelos baseados em drogas são mais simples, pois dependem apenas de uma injeção. Porém, as drogas como o VEGF têm um preço bastante elevado, o que dificulta o seu uso no desenvolvimento de modelos experimentais em países em desenvolvimento, como o Brasil. A partir desta problemática, optamos por desenvolver um modelo simples, baseado apenas em uma injeção intravítrea, com a utilização de uma substância de baixo custo, facilmente encontrada na natureza: o látex de seringueira.

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um modelo experimental de neovascularização de retina em coelhos, utilizando uma substância protéica derivada do látex, de característica angiogênica, através de sistemas de liberação lenta, microesferas de PLGA, colocadas dentro da cavidade vítrea.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo das amostras (FAL):

O látex natural foi extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, pertencente aos clones RRhim 600 e GT-1 de um mesmo seringal, fornecido pela empresa Globbor, Guapiaçu, São Paulo-Brasil. A extração foi realizada pelo processo tradicional de incisão em formato de meia espiral, a uma altura de 60 a 90 cm, através do floema da árvore. As células lactíferas, assim expostas, permitem a drenagem de um líquido de aspecto leitoso que, neste estado, denomina-se látex natural, de composição heterogênea (figura 3). Após a separação da borracha e dos demais componentes biológicos que o constituem, o material (o soro) foi submetido à etapa de purificação através da cromatografia líquida (conforme dissertação de Mestrado do Mendonça, 2004). Deste procedimento, obtiveram-se 3 frações, as quais foram ensaiadas quanto à sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e induzir a angiogênese. Os resultados comprovaram que a fração 1 (FAL) apresentou maior atividade de acordo com Mendonça 2004, a qual foi utilizada neste estudo.



Figura 3 - Coleta do látex. **(A)** Fotografia de um seringal localizado no interior de São Paulo, demonstrando a plantação organizada das seringueiras. **(B)** Detalhe da incisão, em meia espiral, na casca da seringueira. **(C)** Correto procedimento da coleta do látex (figura doada por Ricardo Mendonça).

3.2 Preparação das microesferas

As microesferas foram desenvolvidas por pesquisadores do Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. No estudo, foram utilizadas microesferas poliméricas, compostas de uma blenda de polímeros derivados do poli-láctico, poli-glicólico, poli-hidroxiálcanoatos e poli-caprolactonas, com e sem a fração angiogênica derivada do látex natural (FAL) na sua composição, como sistema de liberação sustentada da substância angiogênica dentro da cavidade vítrea dos coelhos. Copolímeros biodegradáveis como poli (L-lactídeo-co-glicolídeo (PLGA) são polímeros, composto por 50 mol % de L-lactídeo e 50 mol % de glicolídeo (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Os dispositivos poliméricos foram preparados pela dissolução de 0,31 g da Blenda polimérica em 1,2 ml de cloreto de metileno (Sigma-Aldrich). Quantidades específicas (10, 30 e 50 mg) de FAL foram dissolvidas em 1 ml de solução salina a 0,9% que contém 27,9 mg de albumina de soro bovino (BSA; Sigma-Aldrich) e 61 mg do polímero, álcool vinil (PVA; Sigma-Aldrich). Esta solução foi, então, adicionada à solução de polímeros, e emulsificada através de um gene vortex (firsher Scientific, Pittsburgh, PA) por 2 minutos, obtendo-se assim dispositivos injetáveis, nas concentrações de 10, 30 ou 50 µg/0,1ml. No grupo controle, as microesferas foram preparadas utilizando-se a mesma técnica e concentração, mas sem a adição da substância angiogênica (FAL). Os detalhes específicos de composição e proporção das blendas poliméricas utilizadas nas micropartículas estão protegidos pelo pedido de Patente PI# PI 0603513-2, depositado junto ao

Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Estas formulações são preconizadas para utilização como sistemas de vetorização de inúmeros outros fármacos e sistemas protéicos aplicadas às mais diversas áreas

3.3 Animais

Foram utilizados 32 coelhos albinos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), do sexo feminino, pesando aproximadamente 2,5 kg, de acordo com a resolução da ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), para o uso de animais em pesquisa. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). As injeções das microesferas foram realizadas na sala de cirurgia experimental do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, cujo biotério abrigou os animais durante todo o período de estudo.

Os coelhos foram separados em 4 grupos, composto por 8 animais, conforme descrito inferiormente. Os animais dos grupos I, II e III foram submetidos à injeção intravítrea de 0,1ml das microesferas de PLGA contendo a fração angiogênica derivada do látex natural (FAL), em diferentes quantidades, através da injeção com agulha de insulina em região justa-limbar do olho direito. Os animais do grupo IV foram submetidos à injeção intravítrea de 0,1ml das microesferas sem a FAL, na mesma região ocular, considerado o grupo controle.

Grupo I recebeu microesferas contendo 10µg da FAL;

Grupo II recebeu microesferas contendo 30 µg da FAL;

Grupo III recebeu microesferas contendo 50 µg da FAL;

Grupo IV, recebeu microesferas sem a FAL (grupo controle);

Os coelhos foram alojados conforme as recomendações do CETEA, com padrão convencional de controle sanitário, no Biotério da Cirurgia Experimental da FMRP/USP, ficando confinados em gaiolas individuais, de tamanho considerado adequado a eles, com piso de maravalha, em ambiente com temperatura média de 25°C, ventilação e umidade adequadas, exaustor de ar e boa luminosidade, variando de acordo com a luz solar. Não houve restrição de água, nem de alimentação, constituída de ração animal própria para a espécie.

3.4 Implante intravítreo das microesferas

Para o procedimento de injeção das microesferas, os animais foram previamente anestesiados, utilizando-se uma injeção intramuscular de 50 mg/Kg de hidrocloreto de ketamina (Ketalar[®]) e 4mg/Kg de xylasina (Coopazine[®], Schering-Plough Coopers – 20mg/ml), além da instilação tópica de colírio anestésico de proximetacaína (Anestalcon[®], Alcon) imediatamente antes da injeção. A analgesia foi mantida com tiopental sódico intravenoso (através da veia marginal de uma das orelhas do coelho). A dilatação pupilar prévia foi realizada com colírio de tropicamida a 1% e fenilefrina a 2,5%, ambos tópicos. Antes da injeção intravítrea, foi instilado colírio de ofloxacina a 0,3% (Oflox[®], Allergan) no olho direito (OD), repetindo-se no término do procedimento, mantendo-o 4 vezes ao dia durante 5 dias, como profilaxia antibiótica. As injeções foram feitas sob cuidados de antisepsia, no volume de 0,1 ml, com agulha de insulina, em região justa-limbar (a 1mm do limbo temporal) do olho

direito de cada animal. Todo o estudo foi acompanhado por biólogo, responsável tanto pela administração das drogas anestésicas, como pela manipulação dos animais (figuras 4 e 5).

3.5 Avaliação dos animais:

Os coelhos foram avaliados, semanalmente, por meio de oftalmoscopia binocular indireta, retinografia e angiografia fluoresceínica, realizadas antes da injeção da FAL e em 7, 14, 21 e 28 dias. Durante todos os procedimentos, os animais foram dilatados e anestesiados previamente, conforme descrito anteriormente. O estudo fotográfico foi realizado com o retinógrafo TOPCON 50IA (TOPCON, Tóquio, Japão), para avaliação das alterações vasculares da retina. Para a realização da angiografia utilizou-se a injeção de 1ml de fluoresceína sódica a 5% (Ophthalmos, São Paulo, Brasil), na veia marginal de uma das orelhas do coelho, pelo mesmo acesso já realizado para manutenção da analgesia, seguida de infusão em bolo de 1 ml de soro fisiológico 0,9% (figuras 4 e 5).

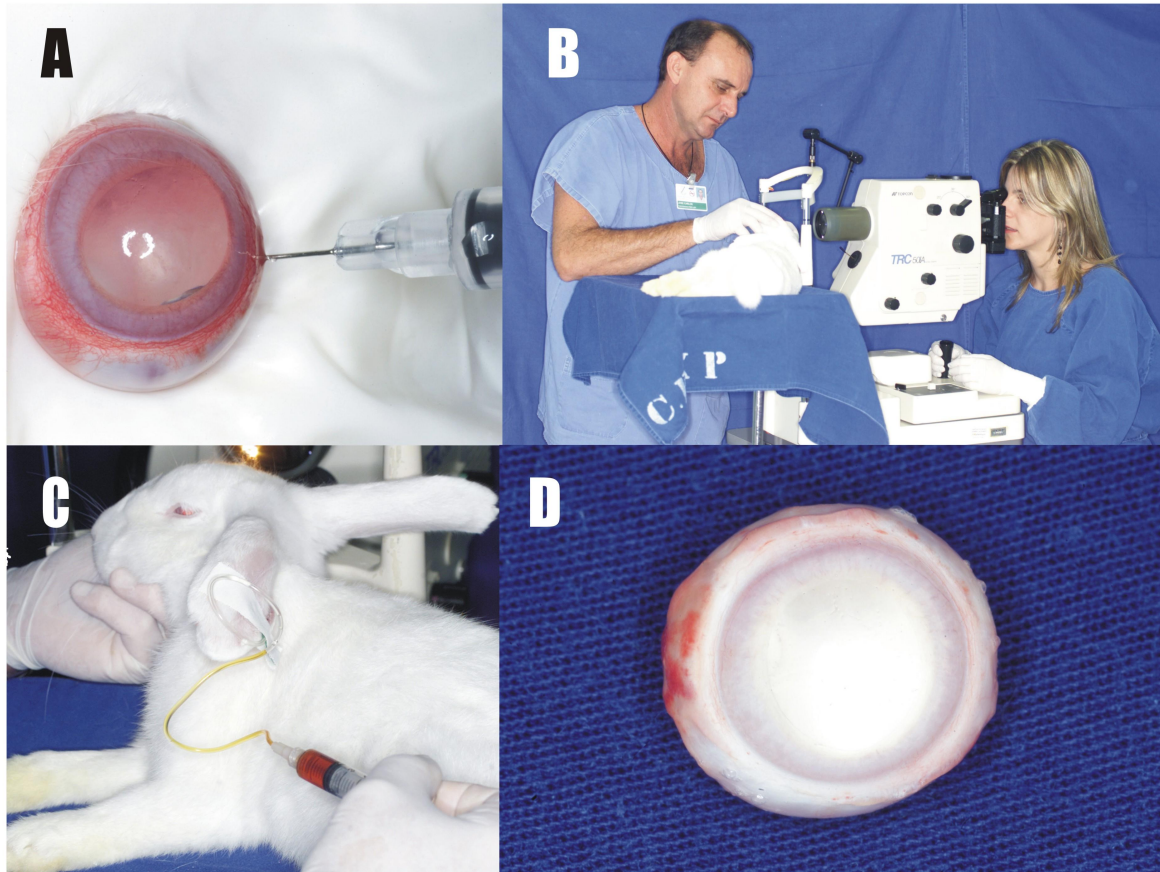


Figura 4 - Figura esquemática da metodologia utilizada neste estudo. **(A)** Injeção intravítrea das microesferas no olho direito do coelho. **(B e C)** Acompanhamento semanal dos coelhos com retinografia e angiografia fluoresceínica durante 28 dias. **(D)** Olho enucleado para avaliação histopatológica.

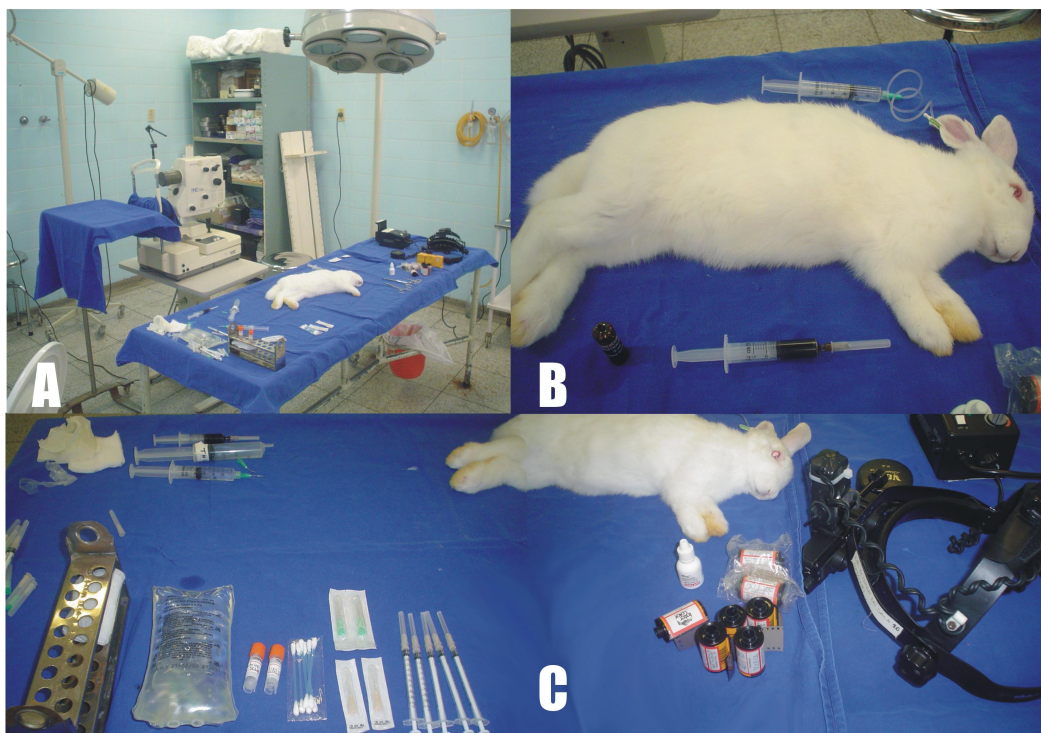


Figura 5 - Sala de procedimento e material usado para o estudo. **(A)** Sala de procedimento. **(B)** Coelho anestesiado previamente aos procedimentos; **(C)** Material usado para injeção intravítrea das microesferas e avaliação semanal dos animais com oftalmoscopia indireta, retinografia e angiografia fluoresceínica.

3.6 Estudo Histopatológico

No estudo histopatológico, realizado após 4 semanas, foram utilizados 16 coelhos (sendo 4 do grupo I, 4 do grupo II, 4 do grupo III e 4 do grupo IV). Os olhos experimentais destes animais foram analisados com o microscópio de luz, e 8 deles (2 de cada grupo) foram preparados para cortes semifinos.

Os coelhos foram sacrificados com dose letal de tiopental sódico (25mg/Kg) intravenoso (Thiopentax, Cristália), no 28^o dia após o estudo angiográfico, utilizando-se a mesma via de acesso usada para a injeção do contraste - a veia marginal de uma das orelhas do coelho. Os olhos foram então enucleados, livrados dos tecidos adjacentes e fixados conforme descrito a seguir, para estudo histopatológico (figura 6).



Figura 6 - Olho de coelho enucleado para estudo histológico

A solução fixadora empregada para a preparação do exame com microscopia de luz foi o formaldeído a 4%, recentemente preparado a partir do paraformaldeído, em tampão fosfato de Sorensen 0,1M, pH 7,2. A calota posterior do globo ocular foi separada através de uma incisão justa-limbar, desprezando-se a parte anterior. Tal porção posterior permaneceu no fixador por 24 horas, a 4°C. Em seguida, foi desidratada em álcoois de concentração crescente até o álcool absoluto, depois transferida para xilol, xilol/parafina e, então, vários banhos de parafina a 60°C precedendo o banho final, realizado em estufa a vácuo, durante 2 horas. Dos blocos, foram produzidos cortes de 5 micrômetros de espessura, em micrótomo Reichert- Jung, modelo RM 2065 (Leica Instruments[®], Alemanha). Os cortes, corados em hematoxilina e eosina (H.E.), foram observados com o microscópio de luz (Olympus BK 50[®], Tóquio, Japão) e imagens obtidas com registros fotográficos, utilizando-se o fotomicroscópio (Nikon DXM 1200, Japão).

Os 8 olhos destinados para cortes semifinos, tiveram o segmento posterior recortado do restante do globo ocular, os quais ficaram imersos em solução de formaldeído a 2% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, durante 4 horas, a 4%. Após lavagem em tampão durante 30 minutos, o segmento posterior foi recortado por um corte horizontal, passando pelo nervo óptico, e, em seguida, fragmentos desse segmento, com aproximadamente 1,0µm de espessura, foram refixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, por 2 horas, a 4%, e desidratados com uma série

crescente de etanóis. Os fragmentos de retina foram, então, tratados com óxido de propileno e incluídos em Epon 812. Dezoito cortes semifinos de 0,5 μ m obtidos com ultramicrotomo Reichert Ultracut S (Leica Instruments[®], Alemanha) foram colhidos em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina 1,0% e analisados com microscópio de luz (Carl Zeiss[®], Alemanha). A partir desses cortes, foram obtidos registros fotográficos de imagens representativas da retina, utilizando-se o fotomicroscópio (Nikon DXM 1200, Japão).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No presente estudo, empregou-se a análise estatística descritiva para caracterizar a percentagem de coelhos que desenvolveram neovascularização de retina nos 4 grupos de estudo, através da avaliação angiográfica característica e análise histológica compatível com neovasos retinianos. Considerou-se uma amostra de 32 coelhos (unidade experimental), divididos em 4 grupos, nos quais foram realizadas injeções intravítreas de microesferas e sacrificados em 4 semanas.

RESULTADOS

No acompanhamento dos animais, após a injeção intravítrea das microesferas, o exame de inspeção evidenciou hiperemia conjuntival com injeção ciliar no primeiro dia pós-injeção em todos os animais. Porém, 6 animais do grupo III evoluíram com piora da hiperemia conjuntival, com formação de neovasos de íris a partir da 2ª semana após a injeção. A formação de catarata foi observada em 1 animal do grupo II e 1 animal do grupo III, que foram, então, retirados do estudo, pela impossibilidade da observação da retina. Durante todo o experimento, a córnea permaneceu clara, sem edema, não ocorrendo secreção muco-purulenta ou endoftalmite.

Em relação aos achados oftalmoscópicos, observou-se em todos os grupos que o material injetado (as microesferas em suspensão), de aspecto esbranquiçado, formou um depósito que permaneceu localizado parte na porção média e parte na porção inferior da cavidade vítrea, até o final do experimento, com redução gradativa do mesmo no decorrer das semanas. Porém, 1 coelho do grupo I e 1 coelho do grupo III permaneceram sem visualização da retina (indevassável), provavelmente pela não dissolução da suspensão, sendo então descartados do estudo. Presença de hemorragia vítrea discreta foi observada em 1 coelho do grupo II no exame da primeira semana pós-injeção, com absorção total espontânea em uma semana, que não impediu o exame da retina, permitindo a permanência deste animal na pesquisa. Não houve descolamento de retina iatrogênico em nenhum animal estudado. Dois animais morreram (1 do grupo II e 1 do grupo IV) durante o experimento, sendo assim

excluídos do estudo. A seguir apresentar-se-ão os resultados detalhados de cada grupo experimental.

4.1 Grupo I (10µg/ml FAL)

Todos os olhos dos coelhos (n=7) do grupo I demonstraram aumento da tortuosidade vascular retiniana, associado a discretas alterações telangiectásicas e hemorragias puntiformes 14 dias após a injeção intravítrea das microesferas contendo 10µg da FAL. Estas alterações se mantiveram até a 4^a semana de avaliação (figura 7), sem o desenvolvimento de neovasos. O exame de angiografia fluoresceínica não demonstrou extravasamento do corante em nenhum dos períodos estudados. No estudo histopatológico com microscopia de luz, em sessões de retina adjacentes ao nervo óptico, não se observou a presença de neovasos.

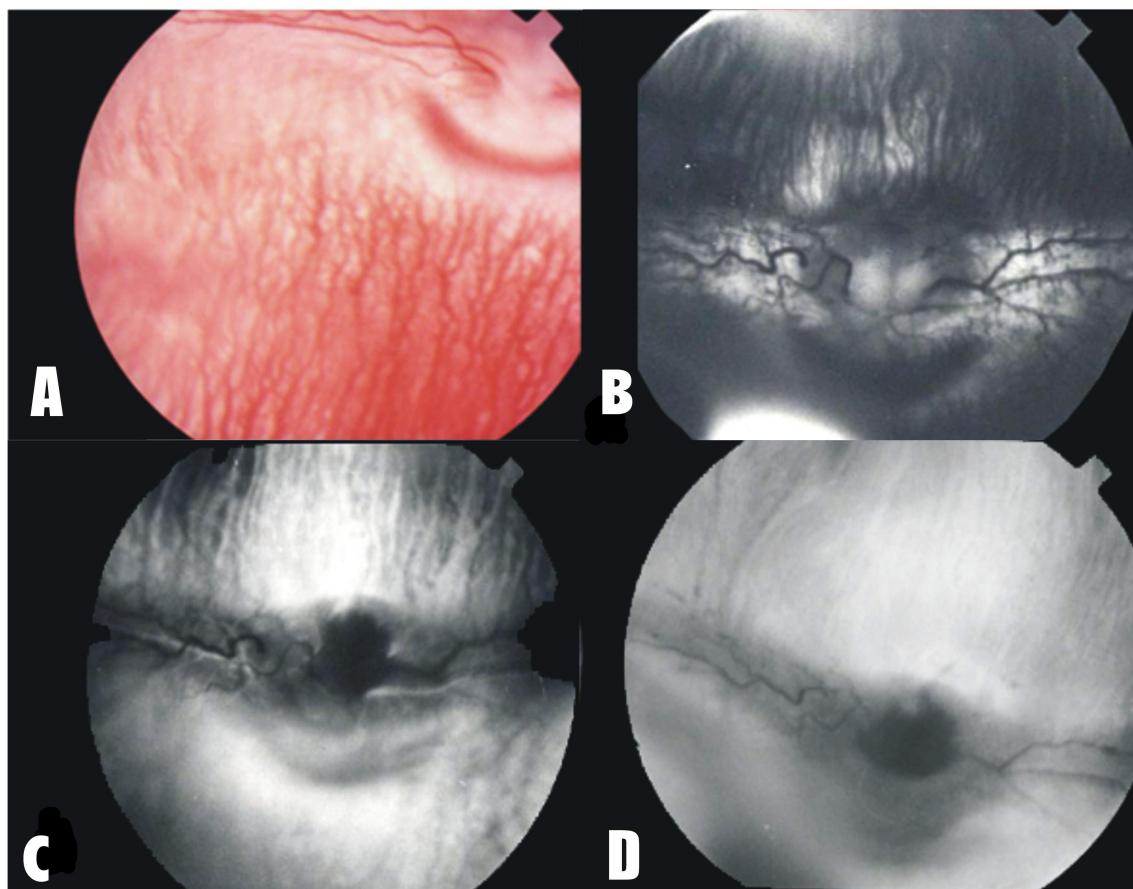


Figura 7 - Fotografias da retina do coelho 2 do **grupo I**. **(A)** Retinografia colorida antes da injeção intravítrea das microesferas contendo 10 μ g da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(B, C e D)** Aneirtra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente, realizadas 28 dias após a injeção intravítrea da FAL demonstrando aumento da tortuosidade vascular e alterações telangiectásicas. Não se observa a presença de neovasos.

4.2 Grupo II (30µg/ml FAL)

Todos os olhos do grupo II (n=6) apresentaram alterações vasculares semelhantes ao grupo I, com aumento da tortuosidade vascular e alterações telangiectásicas peri-disco óptico e ao longo dos raios medulares 7 dias após a injeção intravítrea das microesferas contendo 30µg da FAL (figura 8). Cinquenta por cento deste grupo desenvolveu neovascularização retiniana, verificada na angiografia 21 dias após a injeção, com hiperfluorescência progressiva do disco sugestiva de NV (figura 9), evoluindo com tração fibrovascular no 28º dia (figura 10). O estudo histopatológico mostrou quantidade aumentada de vasos, com características de neovasos, em secções de retina adjacentes ao disco óptico dos coelhos deste grupo, não verificados em cortes da mesma região nos coelhos do grupo controle.

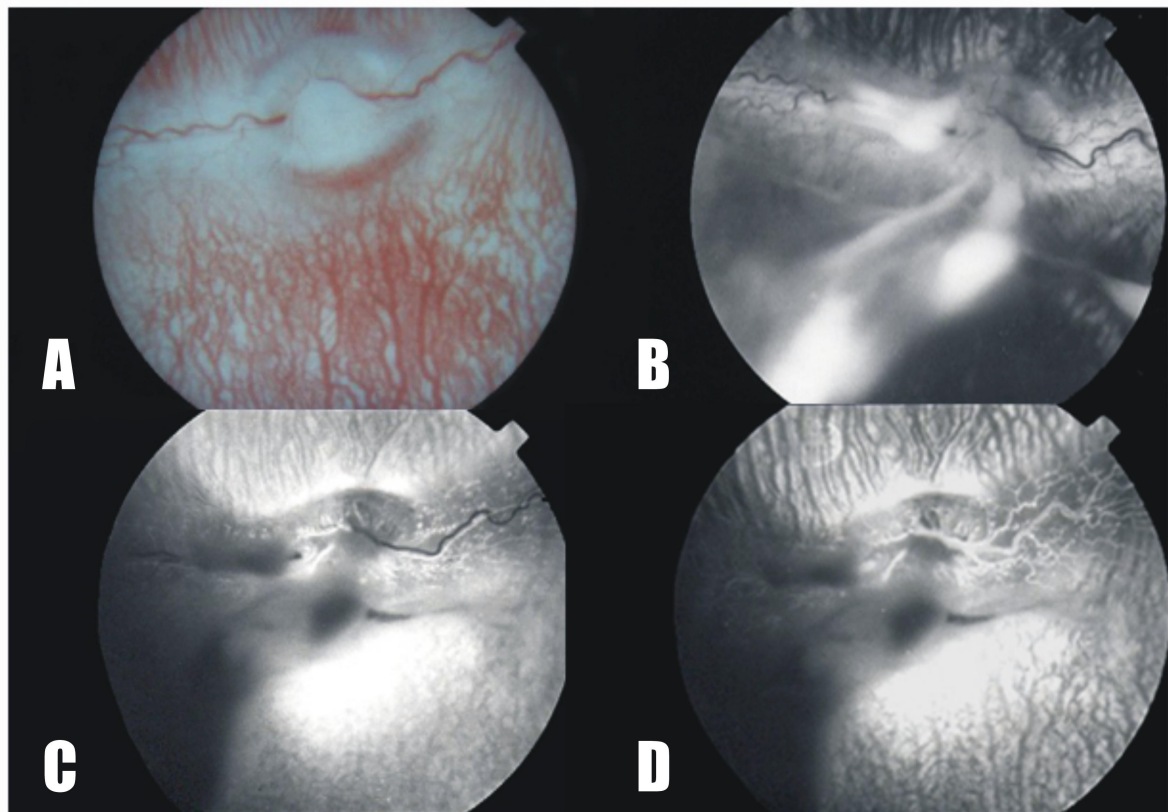


Figura 8 - Fotografias da retina do coelho 3 do **grupo II**. **(A)** Retinografia colorida antes da injeção intravítrea das microesferas contendo 30 μ g da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(B, C e D)** Aneritra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente, realizadas 7 dias após a injeção intravítrea da FAL demonstrando alterações vasculares com aumento da tortuosidade e telangiectasias.

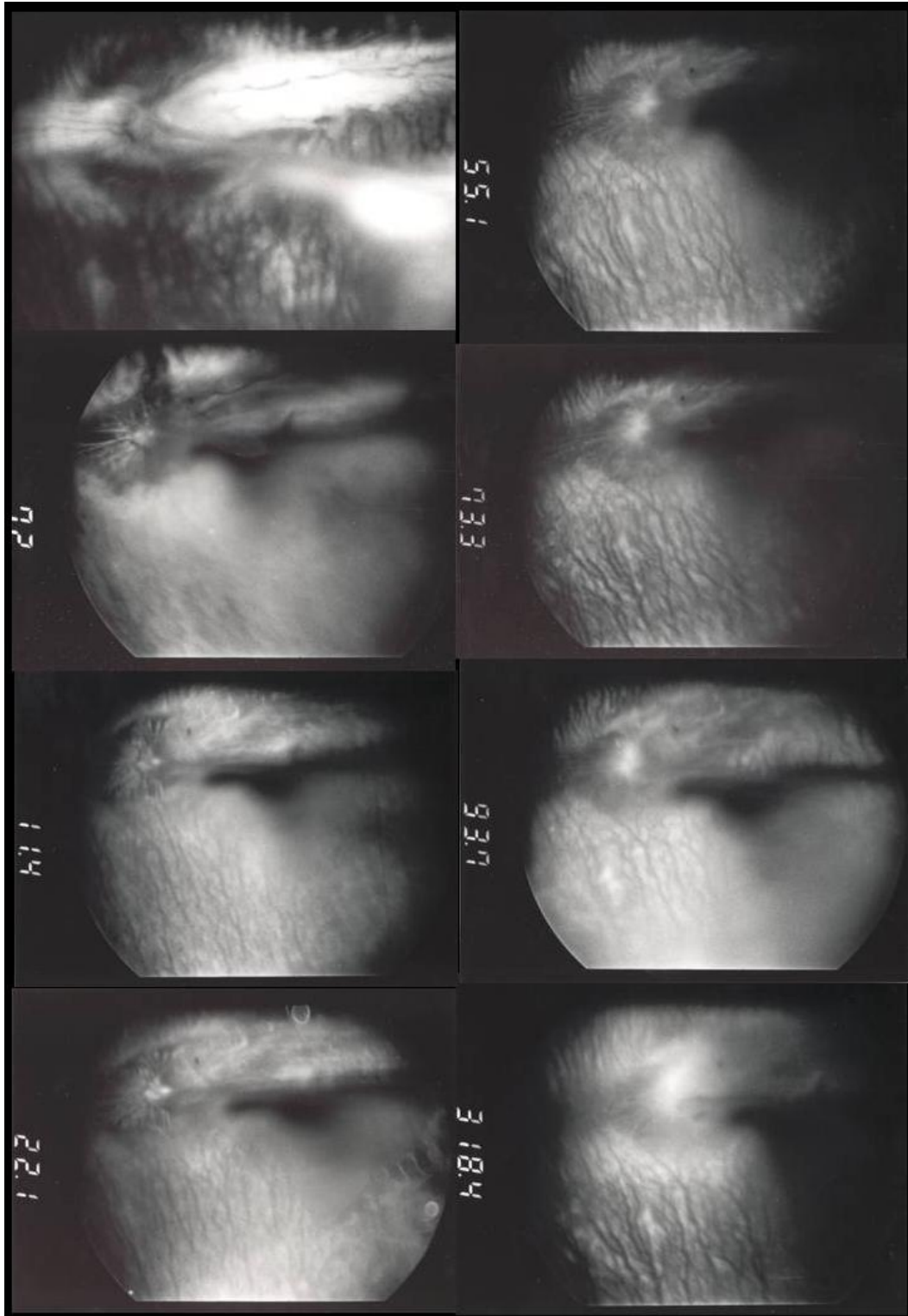


Figura 9 - Seqüência fotográfica da retina do coelho 3 do **grupo II** realizada 21 dias após a injeção intravítrea das microesferas contendo 30 μ g da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL) demonstrando hiperfluorescência progressiva do disco sugestiva de neovascularização.

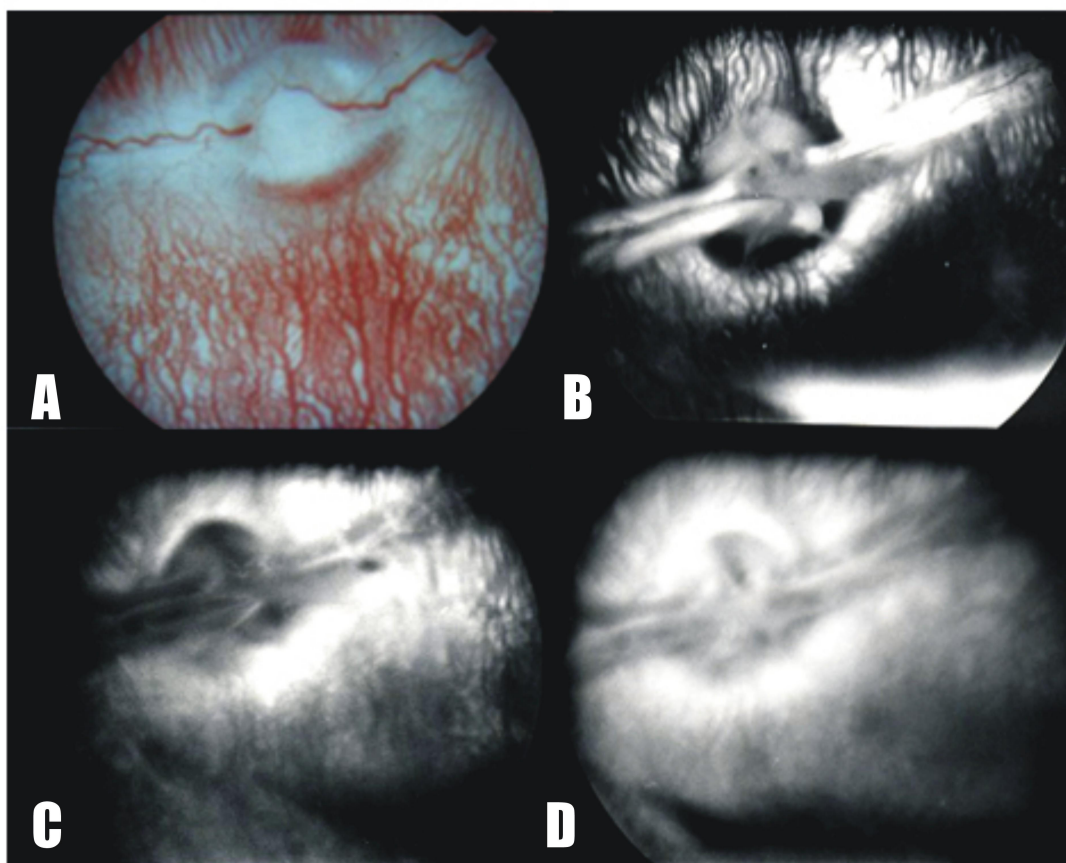


Figura 10 - Fotografias da retina do coelho 3 do **grupo II**. **(A)** Retinografia colorida antes da injeção intravítrea das microesferas contendo 30 μ g da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(B, C e D)** Anertra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente, realizadas 28 dias após a injeção intravítrea da FAL demonstrando proliferação fibrovascular retiniana.

4.3 Grupo III (50µg/ml FAL)

Todos os olhos dos coelhos deste grupo (n=6) apresentaram resposta mais precoce em relação aos grupos anteriores, após a injeção intravítrea das microesferas contendo 50µg da FAL, com acentuado ingurgitamento venoso e aumento da tortuosidade vascular ao longo dos raios medulares a partir da 1^a semana de estudo e formação de neovasos retinianos em 14 dias (figura 11). Na avaliação com 21 dias, pôde-se notar pronunciada tração fibrovascular evoluindo para descolamento de retina tracional (figura 12). A análise por meio de microscopia de luz de secções do tecido retiniano localizadas próximas ao disco óptico mostrou a presença de quantidade anormal de tecido fibrovascular entre o nervo óptico e o depósito das microesferas, onde em um maior aumento, pudemos identificar pequenos vasos retinianos neoformados e outros em formação, não verificados em cortes da mesma região nos coelhos do grupo controle (figura 16). Seis animais deste grupo III evoluíram com neovascularização de íris a partir da 2^a semana pós-injeção, confirmada pela angiografia de íris (figura 13) e histologia do segmento anterior.

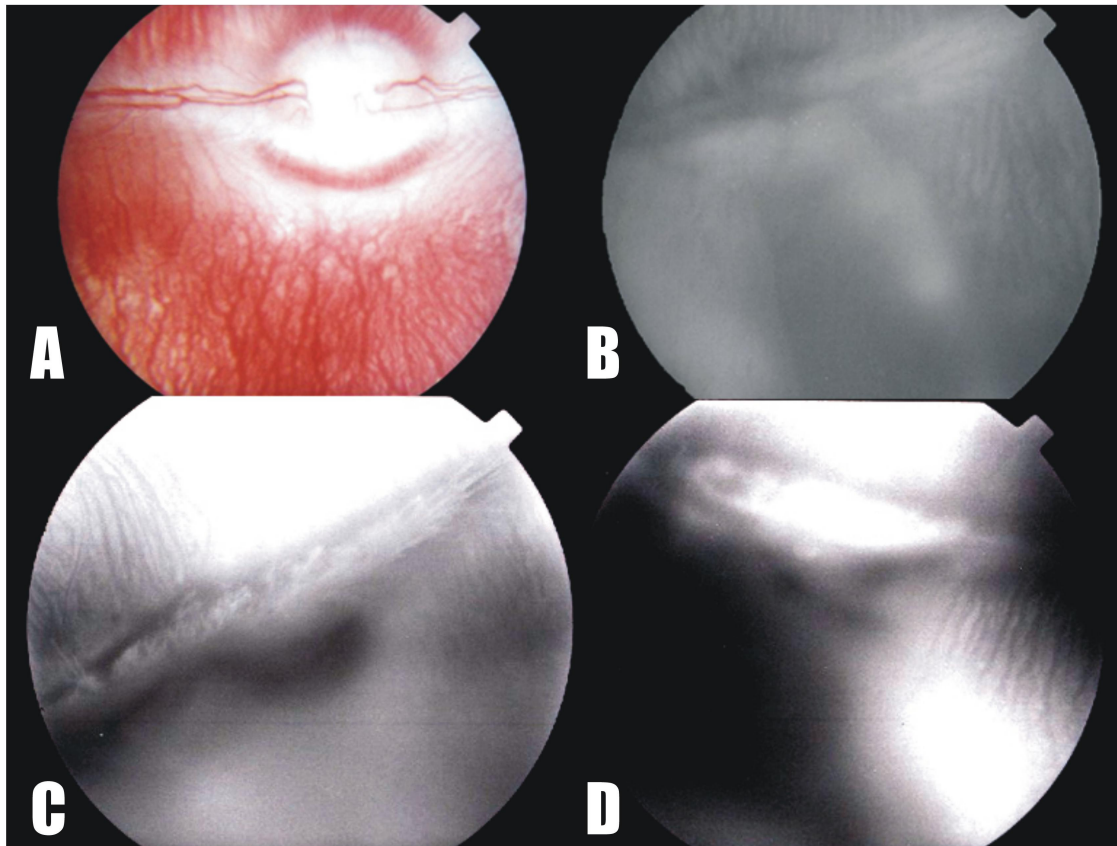


Figura 11 - Fotografias da retina do coelho 5 do **grupo III**. **(A)** Retinografia colorida antes da injeção intravítrea das microesferas contendo 50 μ g da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(B, C e D)** Aneirtra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente, realizadas 14 dias após a injeção intravítrea da FAL demonstrando hiperfluorescência progressiva ao longo dos raios medulares sugestiva de neovascularização.

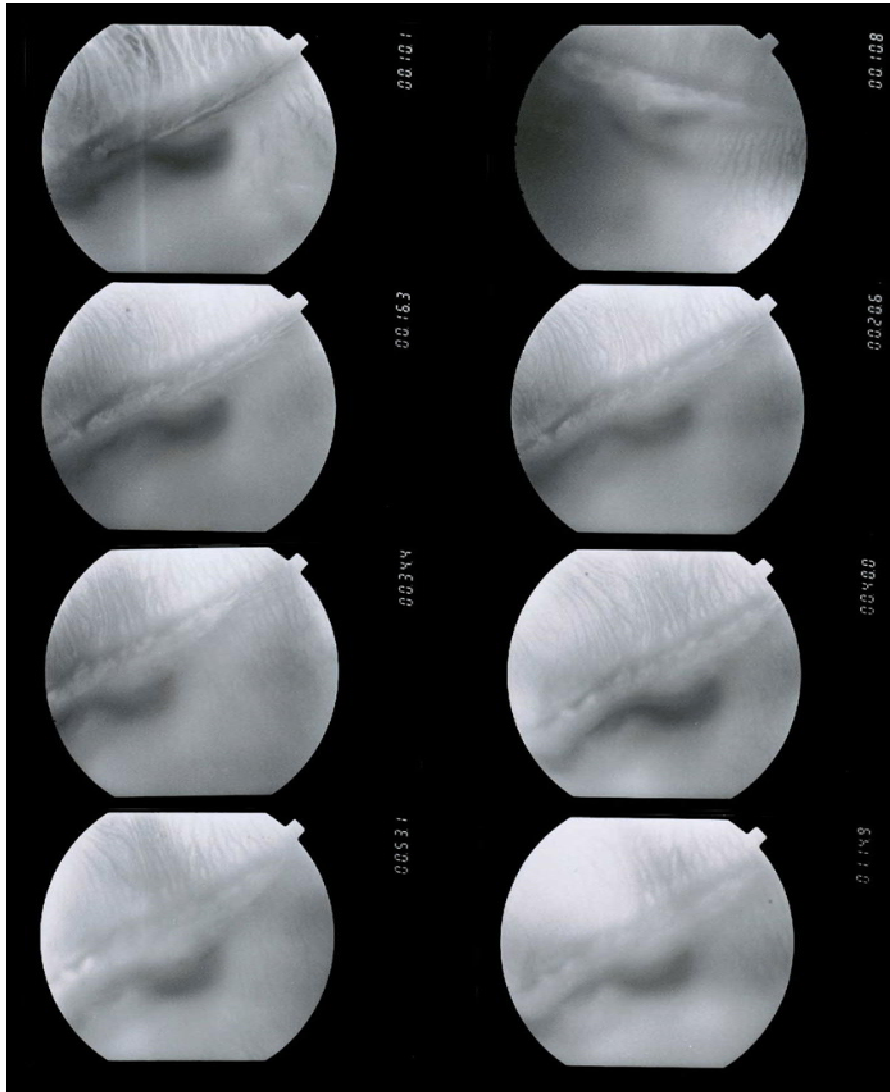


Figura 12 - Seqüência fotográfica da retina do coelho 5 do **grupo III** realizadas 21 dias após a injeção intravítrea das microesferas contendo 50µg da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). Observa-se hiperfluorescência progressiva ao longo dos raios medulares sugestiva de neovascularização e proliferação fibrovascular retiniana.

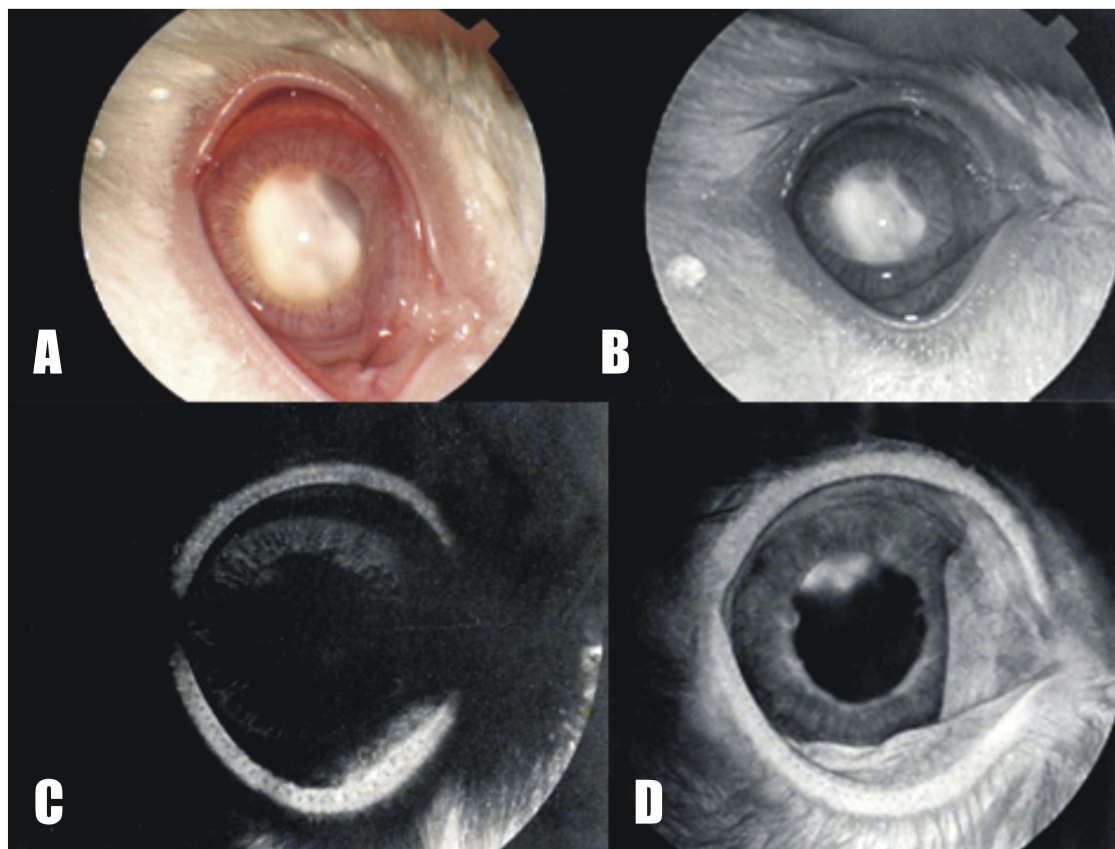


Figura 13 - Fotografias da íris do coelho 5 do **grupo III**, realizadas 21 dias após a injeção intravítrea das microesferas contendo 50µg da fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(A, B, C e D)** Fotografia colorida, anerythra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente. Observa-se hiperfluorescência progressiva dos vasos irianos, principalmente no bordo da íris, sugestiva de neovascularização de íris.

4.4 Grupo IV (microesferas sem FAL – grupo controle)

Não foram verificadas alterações vasculares, como tortuosidade, hemorragias ou formação de neovasos de retina ou de íris neste grupo (n=7), em nenhum dos períodos estudados, confirmados pelo estudo angiográfico (figuras 14 e 15) e histopatológico (figura 16A).

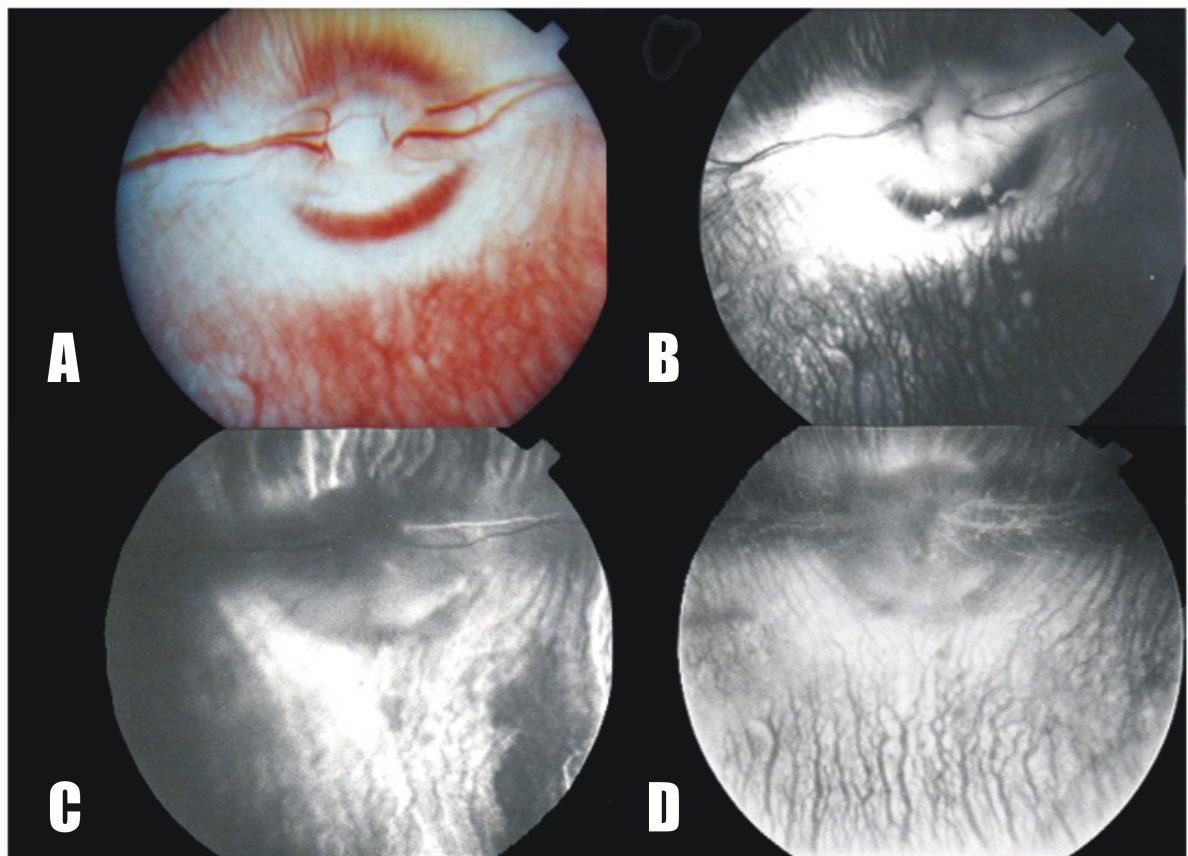


Figura 14 - Fotografias da retina do coelho 2 do **grupo IV – grupo controle**. **(A)** Retinografia colorida antes da injeção intravítrea das microesferas sem a fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(B, C e D)** Aneritra e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente, realizadas 28 dias após injeção intravítrea das microesferas sem a FAL. Não foram verificadas alterações vasculares, como tortuosidade, hemorragias ou formação de neovasos de retina neste grupo durante todo o período estudado.

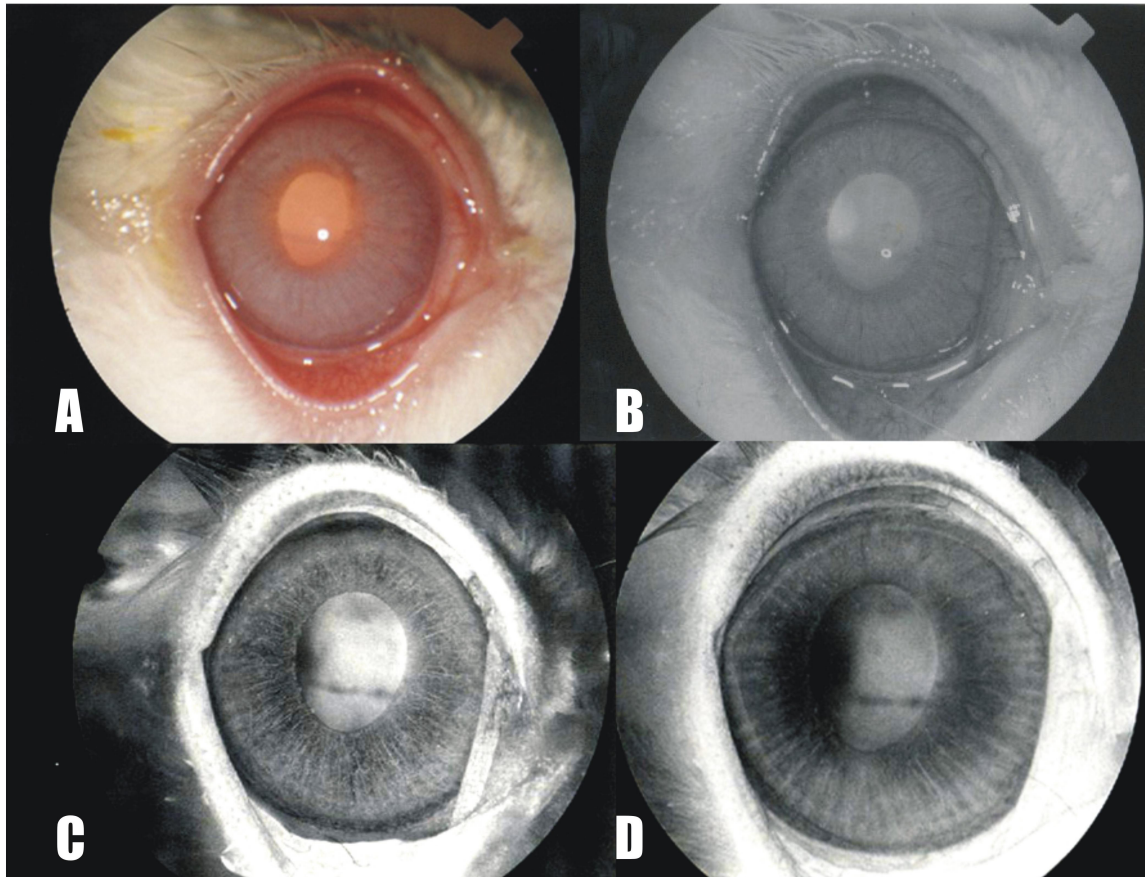


Figura 15 - Fotografias da íris do coelho 2 do **grupo IV – grupo controle**, realizadas 28 dias após a injeção intravítrea das microesferas sem a fração angiogênica derivada do látex natural (FAL). **(A, B, C e D)** Fotografia colorida, anetrta e angiografias (fases precoce e tardia), respectivamente. Não se observou neovascularização de íris neste grupo durante todo o período estudado.

4.5 Estudo Histopatológico

Os resultados do exame histológico, já mencionados antes, estão melhor elucidados nas figuras abaixo com suas respectivas legendas (figuras 16 e 17).

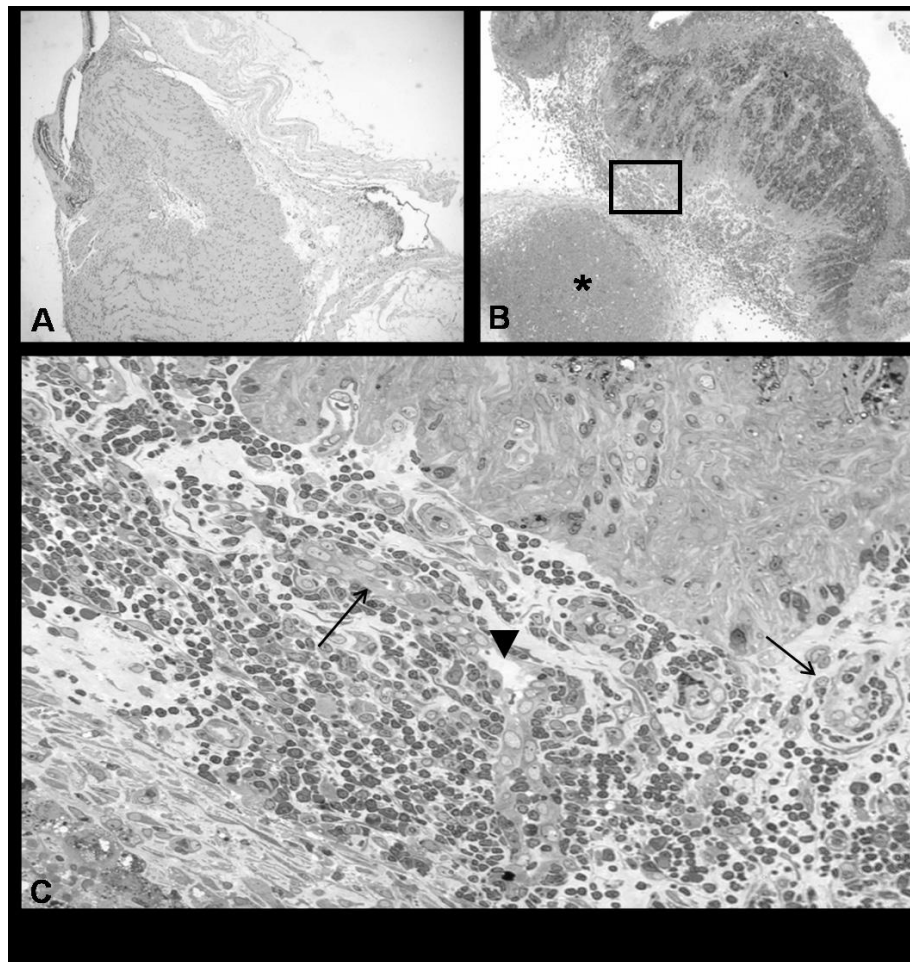


Figura 16 - Fotomicrografias do segmento posterior do olho de coelhos do **grupo IV (A)** e do **grupo III (B,C)**, mostrando a região de fibras nervosas e da cabeça do nervo óptico. **(A)** Secção de parafina corada com H.E. A cabeça do nervo preenche praticamente toda a área da foto e exibe características morfológicas comparáveis às do olho normal. No lado esquerdo superior, visualiza-se a retina artificialmente descolada pela técnica histológica (H.E., x40). **(B)**. Corte semifino (0,5µm de espessura) corado com azul de toluidina, demonstrando a cabeça do nervo óptico. Adjacente à cabeça do nervo óptico, apresenta tecido fibrovascular com vários conglomerados de células endoteliais imaturas, melhor identificadas (área em destaque) na figura (C). O asterisco indica reação inflamatória crônica secundária ao depósito de microesferas no vítreo. Observa-se, também, o desenvolvimento de tecido neovascular entre a cabeça do nervo óptico e o depósito vítreo de microesferas (azul de toluidina, x40). **(C)** Magnificação da área dentro do retângulo em (B). O novo tecido formado está próximo à cabeça do nervo óptico.

Observa-se a presença de infiltrado linfocítico e vasos sanguíneos em formação (neovasos), representados por setas. A cabeça de seta indica o lúmen do neovaso (azul de toluidina, x200).

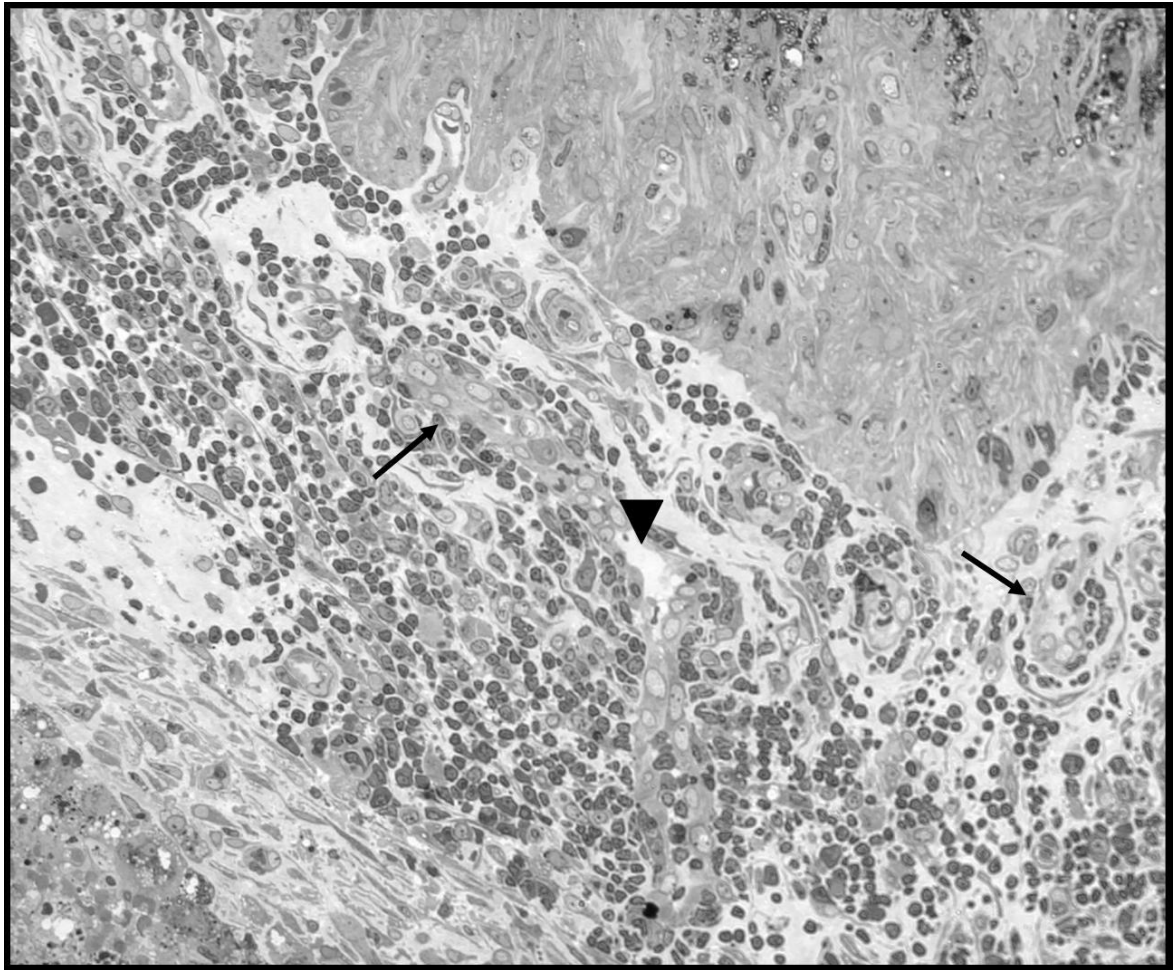


Figura 17 - Fotomicrografia em corte semifino ($0,5\mu\text{m}$ de espessura), corado com azul de toluidina, do segmento posterior do olho experimental do coelho 5 do **grupo III - $50\mu\text{g}/0,1\text{ml}$** , contendo microesferas com a fração angiogênica do látex (FAL), mostrando a região da cabeça do nervo óptico. Observa-se a presença de infiltrado linfocítico e vasos sanguíneos em formação (neovasos), representados pelas setas. A cabeça de seta indica o lúmen do neovaso (azul de toluidina, x200).

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a liberação sustentada da fração angiogênica derivada do látex na cavidade vítrea de coelhos provoca a neovascularização de retina, levando a alterações fundoscópicas semelhantes às induzidas pelo VEGF em modelos animais (OZAKI et al., 1977; ALIKACEM et al., 2000). Embora os níveis de FAL e o seu perfil de liberação encapsulado em microesferas não tenham sido mensurados, obtiveram-se alterações vasculares nos primeiros dias ou semanas, evoluindo com o desenvolvimento de NV retiniana a partir da segunda ou terceira semana após a injeção, dependente da concentração utilizada do fator, como reportado para o VEGF. No grupo em que se utilizou 50µg da FAL, obteve-se resposta mais precoce e mais intensa, com formação de neovasos de retina em 100% dos animais. Este dado sugere que altas concentrações do fator são necessárias, ou mais eficazes, para o desenvolvimento da neovascularização de retina de coelhos. Diferentemente, no grupo em que se utilizou baixas dosagens da FAL, 10µg, observou-se aumento da tortuosidade, dilatação vascular e micro-hemorragias, porém não houve o desenvolvimento de neovascularização retiniana. Após a NV retiniana, ocorre descolamento tracional da retina, resultado similar à da retinopatia diabética proliferativa (MATHEWS et al., 1997; BOULTON et al., 1998). Para um melhor entendimento do estímulo vasogênico, estudos em andamento objetivam caracterizar o perfil de liberação da FAL encapsulado em microesferas de PLGA no vítreo de coelhos.

O material derivado do látex, de natureza protéica, demonstrou capacidade de indução de angiogênese e de aumento da permeabilidade vascular (MENDONÇA, 2004), semelhante ao que ocorre quando se realiza a aplicação do VEGF na membrana corio-alantóidea, assim como de outros fatores de crescimento como o FGF- β e PDGF (WILTING, 1991 e 1992) ou na cavidade vítrea de animais (OZAKI et al., 1997; ALIKACEM et al., 2000). A maioria das substâncias identificadas como indutores do aumento da permeabilidade vascular e da angiogênese, incluindo o VEGF, TGF- β , angiogenina, angiotropina, angiopoetina-1 e trombospondina, apresentam identidade protéica, constituindo-se de polipeptídeos de diversos tamanhos e pesos moleculares, sugerindo uma possível homologia funcional da fração do látex com estes fatores de crescimento.

A neovascularização verificada nos coelhos dos Grupo II e III ocorreu ao redor do disco, como verificado em outros estudos (OZAKI et al., 1997; ALIKACEM et al., 2000). O animal mais comumente usado tem sido o coelho, embora animais pequenos incluindo o rato e o camundongo também são utilizados (FOURNIER et al., 1981; MUTHUKKARUPPAN; AUERBACH, 1979). No estudo em retina, os coelhos são úteis, pois desenvolvem neovasos (TANO et al., 1981; ANTOSZYK et al., 1993; SUTO et al., 1992) e seus olhos são suficientemente grandes para permitir fácil injeção de lipossomos, microesferas ou implantação de *pellets* com pequeno ou nenhum dano pela manipulação cirúrgica, assim como acompanhamento fundoscópico com fotografias. Indo além, a retina de coelhos possui vasos retinianos na sua superfície e

provavelmente por este motivo tem maior contato com drogas e fatores injetados no vítreo. Isto a torna mais suscetível ao estímulo angiogênico do que, por exemplo, a retina de primatas, onde os vasos são intra-retinianos, como na retina humana. Tais peculiaridades anatômicas facilitam o monitoramento direto da resposta neovascular, de forma não invasiva, e permitem, inclusive, a aplicação tópica da droga em teste. Outras vantagens deste modelo experimental em estudo incluem a acessibilidade e custo relativamente baixo dos coelhos em comparação aos primatas ou porcos (MILLER, 1997).

A caracterização de vasos neoformados apenas pelo estudo histopatológico é tarefa difícil. Felizmente, pôde-se contar com a confirmação angiográfica característica de neovascularização, demonstrando hiperfluorescência progressiva (figura 9), e análise histológica compatível com neovasos retinianos em uma região normalmente avascular (figura 17). Apesar de se ter conseguido a gênese de novos vasos, o mecanismo pelo qual estes foram gerados está longe de ser esclarecido, uma vez que o fator específico do látex ainda não foi totalmente purificado. Sabe-se que a angiogênese faz parte de um processo reparador, cicatricial na vida adulta (RISAU, 1997). Baseado nisto, além da hipótese da LAF atuar de modo semelhante a um fator vasogênico (ação VEGF-like), é oportuna a especulação de que o mesmo possa atuar como um corpo estranho protéico, que desencadeia uma reação inflamatória reparadora e é capaz de gerar uma proliferação fibrovascular na cabeça do nervo óptico. Porém, o presente estudo não tem como objetivo diferenciar reação de corpo estranho do estímulo angiogênico puramente. Para

tentar esclarecer esta dúvida, iniciamos estudos com drogas antiinflamatórias e agentes anti-angiogênicos, para comparar os efeitos destas drogas, e tentar esclarecer se o estímulo é predominantemente inflamatório, vasogênico, ou misto. Algumas observações são, entretanto, pertinentes: 1) em um modelo de regeneração de pele, FAL parece estimular a produção de interleucina-10, que tem propriedades anti-inflamatórias (LAMOUNIER, 2004); 2) em um modelo de neovascularização *corneal pocket*, látex puro vulcanizado foi colocado no centro da córnea em coelhos do grupo controle e não ocorreu o desenvolvimento de neovasos, o que contradiz a teoria de reação de corpo estranho (MRUÉ, 2000) e 3) embora tenha sido notado hiperemia conjuntival em 6 coelhos do grupo III, não houve *haze* inflamatório importante e este sinal conjuntival pode estar relacionado ao descolamento tracional crônico da retina.

Apesar de já existirem vários modelos experimentais de NV retiniana utilizando como estímulo angiogênico o Laser ou o VEGF, o modelo desenvolvido neste trabalho é um método mais simples e menos oneroso, pois a fração angiogênica deriva de uma substância encontrada em abundância no território nacional: o látex da seringueira (*Hevea Brasiliensis*). O custo para obtenção de um micrograma de FAL (Pelenova Biotecnologia S/A, São Paulo/SP) é cerca de 25 a 50 vezes menor do que aquele para a obtenção da mesma quantidade de VEGF (Catálogo SIGMA, 5µg VEGF= US\$ 500). Portanto, o modelo torna-se acessível à pesquisa em países em desenvolvimento, com a possibilidade do estudo de drogas anti-angiogênicas,

que talvez possam ser empregadas para uma das duas maiores causas de cegueira no mundo: a Retinopatia Diabética.

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a injeção intravítrea da fração angiogênica derivada do látex (FAL), encapsulada em microesferas para liberação lenta, foi capaz de induzir a neovascularização retiniana em coelhos nas concentrações de 30µg/0,1ml e 50µg/0,1ml, permitindo assim, a criação de um modelo experimental de angiogênese em retina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adamis AP, Millar JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo T-K, Yeo K-T. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994; 118:445-450.
2. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, D'Amore PA, Miller JW. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia associated iris neovascularization in a non-human primate. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:66-71.
3. Adamis AP, Altaweel M, Bressler NM. Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. *Ophthalmology* 2006; 113:23-28.
4. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen MS, Aiello LM, Ferrara N, King GL. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331:1480-1487.
5. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LEH. Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10457-10461.

6. Aiello LP. Vascular endothelial growth: 20th-century mechanisms, 21st-century therapies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(9):1647-1652.
7. Aiello LP, Gardner TW, King GL. Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 1998; 21(1):143-156.
8. Alikacem N, Yoshizawa T, Nelson KD, Wilson CA. Quantitative MR imaging study of intravitreal sustained release of VEGF in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1561-1569.
9. Amin RH, Frank RN, Kennedy A. Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(1):36-47.
10. Antoszyk A, Gottlieb J, Machemer R, Hatchell D. The effects of intravitreal triamcinolone acetonide on experimental pre-retinal neovascularization. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1993; 231:34-40.
11. Arjamaa O & Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* 2006; 83(3):473-483.
12. 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* 1954; 38:397.
13. Ashton N. Retinal neovascularization in health and disease. *Am J Ophthalmol* 1957; 44:7-17.

14. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977; 14:53-65.
15. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996; 17:93-102.
16. Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995; 72:333-346.
17. Bauer SM, Bauer RJ, Velazquez OC. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovascular Surg* 2005; 39(4):293-306.
18. Boulton M, Foreman D, Williams G, McLeod DS. VEGF localization in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 1998; 82:561-568.
19. Boycott BB, Dowling JE. Organization of the primate retina: light microscopy. *Proc Roy Soc London Biol* 1969; 255:109-176.
20. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2000; 184: 301-310.
21. Campochiaro PA and the C99-PKC 412-003 Study Group. Reduction of diabetic macular edema by oral administration of the kinase inhibitor PKC 412. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:922-931.
22. Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* 2007; 10(2):133-140.

23. Cohen AI. New details of the ultrastructure of the outer segment and ciliary connectives of the rods of human and macaque retinas. *Anat Rec* 1965; 152:63.
24. Colthurst MJ, Williams RL, Hiscott PS, Grierson I. Biomaterials used in the posterior segment of the eye. *Biomaterials* 2000; 21:649-665.
25. Connolly D, Heuvelman D, Nelson R, Olander J, Eppley B, Delfino J, Siegel N, Leimgruber R, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989; 84:1470-1478.
26. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research* 2001; 49:507-521.
27. Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2005; 112:1747-1757.
28. Danis R, Yang Y, Massicotte S, Boldt C. Preretinal and optic nerve head neovascularization induced by photodynamic venous thrombosis in domestic pigs. *Arch Ophthalmol* 1993; 111:539-543
29. Das A, Mc Guire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Progress in Retinal and Eye Research* 2003; 22:721-748.

30. Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol* 2007; 52 (1):S3-S19.
31. Dvorak H, Brown L, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Ophthalmol* 1995; 146: 1029-1039.
32. Fialho SL. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e implantes biodegradáveis para aplicação oftálmica. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). 2003; 118 f.
33. Flynn JT, Bancalari E, Bachynski B, Buckley EN, Bawon R, Goldberg R, Cassady J, Schiffman J, Feuer W, Jacqueline R, Gillings D, Sim E, Roberts J. Retinopathy of prematurity: diagnosis, severity and natural history. *Ophthalmology* 1987; 94: 620-629.
34. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235:442-447.
35. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996; 87:1153-1155.
36. Fournier G, Luttj G, Watt S, Fenselau A, Patz A. A corneal micropocket assay for angiogenesis in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 21:351-354.
37. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 2005; 438 (7070): 960-966.

38. Garner A. Developments in the pathology of diabetic retinopathy: a review. *J R Soc Med* 1981; 74:427-431.
39. Goad DL, Rubin J, Wang H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1996; 137:2262-2268.
40. Gunningham SP, Currie MJ, Han C. VEGF-B expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *J Pathol* 2001; 193:325–332.
41. Hamilton A, Marshall J, Kohner E, Bowbyes J. Retinal new vessel formation following experimental vein occlusion. *Exp Eye Res* 1975; 20:493-497
42. Hamilton A, Kohner E, Rosen D, Bird A, Dollery C. Experimental retinal branch vein occlusion in rhesus monkeys. I. clinical appearances. *Br J Ophthalmol* 1979; 63:377-387
43. Hannekan A, Li J, Ray J, Gage FH, Baird A. Overexpression of recombinant basic FGF induces massive preretinal neovascularization in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:1024.
44. Hashizoe M, Ogura Y, Kimura H, Moritera T, Honda Y, Kyo M; Hyon SH, Ikada Y. Scleral plug of biodegradable polymers for controlled drug release in the vitreous. *Arch Ophthalmol* 1994; 112:1380-1384
45. Hayashi T, Deguchi K, Nagotani S. Cerebral ischemia and angiogenesis. *Curr Neurovasc Res* 2006; 3(2):119-129.

46. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. Histology of the human eye: an atlas and textbook. Saunders 1971.
47. Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M. The regulation of vascular endothelial growth factors (VEGF-A, -C, and -D) expression in the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 2006; 83(5):1031-1040.
48. Jain R, Shah NH, Malick AW, Rodhes CT. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. *Drug Development and Industrial pharmacy* 1998; 24(8):703-727.
49. Kimura H, Ogura Y, Hashizoe M, Nishiwaki H, Honda Y. A new vitreal drug delivery system using an implantable biodegradable polymeric device. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35(6):2815-2819
50. Kimura H, Sakamoto T, Hinton D, Spee C, Ogura Y, Tabata Y, Ikada Y, Ryan SJ. A new model of subretinal neovascularization in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36(2):2110-2119.
51. Kimura H, Spee C, Sakamoto T, Hinton DR, Ogura Y, Tabata Y, Ikada Y, Ryan SJ. Cellular response in subretinal neovascularization induced by bFGF-impregnated microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:524-528
52. Kimura H, Ogura Y. Biodegradable polymers for ocular drug delivery. *Ophthalmologica* 2001; 215:143-155.
53. Klein R, Klein BE, Moss SE. Visual impairment in diabetes. *Ophthalmology* 1984; 91:1-9.

54. Kohner E, Dollery C, Shakib M, Henkind P, Paterson J, de Oliveira N, Bulpitt C. Experimental retinal branch vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 1970; 69:778-825.
55. Kohner EM. Diabetic retinopathy. *Brit Med J* 1993; 307:1195-1199.
56. Garner A. Developments in the pathology of diabetic retinopathy: a review. *J R Soc Med* 1981; 74:427-431.
57. Lamounier FMC. Avaliação da produção de citocinas inflamatórias in vitro, induzidas pela biomembrana do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em dermatologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2004.
58. Lashkari K, Hirose T, Yazdany J, McMeel JW, Kazlauskas A, Rahimi N. Vascular endothelial growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity. *Am J Pathol* 2000; 156(4):1337-1344M.
59. Lachat JJ, Mrué F, Thomazini JÁ, Coutinho-Netto J. Morphological and biochemical studies of the biocompatibility of membrane manufactured from latex of *Hevea brasiliensis*. *Acta Microscópica* 1997; 6:sup 758.
60. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306-1309.
61. Lewis DH. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin M., Langer R. Biodegradable polymers for ocular drug delivery systems. New York: Marcel Dekker 1990; 01:1-41.

62. Li WW, Grayson G, Folkman J, D'Amore PA. Sustained-release endotoxin, a model for inducing corneal neovascularization. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1991; 32:2906-2911.
63. Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, Mathis A, Chollet P, Favard C, Bayard F, Plouet J. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 1994;112:1476-1482.
64. Martin PM, Roon P, Van Ells TK. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45(9):3330-3336.
65. Mathews MK, Merges C, McLeod DS, Litty GA. Vascular endothelial growth factor and vascular permeability changes in human diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38:2729-2741.
66. Matsumoto M. Experimental study on earlier thrombogenic process in thrombin induced retinal venous obstruction in rabbit eye. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (Acta Soc Ophthalmol Jpn) 1989, 96:1132-1141
67. Mendonça RJ. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2004; 94 f.
68. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via

- signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999; 18(2):363-374.
69. Michaelson I. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal diseases. *Trans. Ophthalmol Soc U K* 1948; 68:137-180
70. Miller JW, Adamis AP, D'Amore P, Molton R, O'Reilly MS, Folkman J, Dvorak HF, Brown L, Berse B, Yeo T, Yeo K. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am. J. Path.* 1994; 145:574-584.
71. Miller J W. Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization. *Am Journal Pathology* 1997; 151(1):281-291.
72. Moritera T, Ogura Y, Honda Y, Wada R, Hyon SH, Ikada. Microspheres of biodegradable polymers as a drug delivery system in the vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991; 32:1785-1790
73. Moritera T, Ogura Y, Yoshimura N, Honda Y, Wada R, Hyon SH, Ikada. Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33:3125-3130.
74. Mrué F. Substituição do esôfago cervical por prótese bio sintética de látex – Estudo experimental em cães. Dissertação (Mestrado em medicina) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

75. Mrué F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. Tese (Doutorado em medicina) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.
76. Muthukkaruppan V, Auerbach R. Angiogenesis in the mouse cornea. *Science* 1979; 205:1416-1418.
77. Namiecinska M, Marciniak K, Nowak JZ. [VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005; 59:573-583.
78. Oliveira MAB, Godoy MF, Souza DRS. Angiogênese e o fator endotelial de crescimento vascular. *Rev Bras Med* 2002; 59(1/2):81-84.
79. Okamoto N, Tobe T, Hackett S, Osaki H, Viores M, LaRochelle W, Zack D, Campochiaro P. Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol* 1997; 151:281-291
80. Ophir A, Blumenkranz M, Claflin AJ. Experimental intraocular proliferation and neovascularization. *Am J Ophthalmol* 1982; 94:450-457.
81. Ozaki H, Hayashi H, Viores SA, Moromizato Y, Campochiaro PA, Oshima K. Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates. *Exp Eye Res* 1997; 64:505-517.

82. Penn J, Tolman B, Lowery L. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:576-585.
83. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8:21-43.
84. Peyman GA, Ganiban GJ. Delivery systems for intraocular routes. *Advanced drug delivery reviews*. 1995; 16:107-123.
85. Pfeiffer A, Spranger J, Meyer-Schwickerath R. Growth factor alterations in advanced diabetic retinopathy: a possible role of blood retina barrier breakdown. *Diabetes* 1997; 46(2):26-30.
86. Pierce E, Avery R, Foley ED, Aiello LP, Smith LEH. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:905-909.
87. Plate KH, Warnke PC. Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* 1997; 35(3):365-372.
88. Porta M, Bandello F. Diabetic retinopathy: a clinical update. *Diabetologia* 2002; 45:1617-1634.
89. Pournaras CJ, Tsacopoulos M, Strommer K, Gilodi N, Leuenberger PM. Experimental retinal branch vein occlusion in miniature pigs induces local tissue hypoxia and vasoproliferative microangiopathy. *Ophthalmology* 1990a; 97:1321-1328

90. Pournaras CJ, Tsacopoulos M, Strommer K, Gilodi N, Leuenberger PM. Scatter photocoagulation restores tissue hypoxia in experimental vasoproliferative microangiopathy in miniature pigs. *Ophthalmology* 1990b; 97:1329-1333
91. Presta M, Dell'Era P, Mitola S. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005 16:159-178.
92. Prince JH. *The rabbit in eye research*. Thomas CC publisher USA 1964.
93. Prost M. Experimental studies on the pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 1988; 72:363-367.
94. Reynaud X, Dorey C. Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:3169-3177.
95. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-4.
96. Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36:336-339.
97. Rubsamen PE, Davis PA, Hernandez E, O'Grady GE, Cousins SW. Prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy with a biodegradable intravitreal implant for the sustained release of fluorouracil. *Arch Ophthalmol* 1994; 112:407-413.

98. Sakuraba T. Experimental retinal vein obstruction induced by transadventitial administration of thrombin in the rabbit. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi (Acta Soc Ophthalmol Jpn)* 1989, (93):978-985
99. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990; 50:1774-1778.
100. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843-845.
101. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitai GH, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 1993; 91:2235-2243.
102. Shima DT, Adamis AP, Yeo K-T, Yeo T-K, Berse B, Brown L. Hypoxic regulation of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) mRNA and protein secretion by human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci. (suppl)* 1993; 34-990.
103. Shima DT, Adamis AP, Ferrara N. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med* 1995; 1(2):182-193.

104. Smith L, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk S, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:101-111.
105. Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 2006; 26:275-278.
106. Stephan CC, Brock TA. Vascular endothelial growth factor, a multifunctional polypeptide. *P R Health Sci* 1996; 15(3):169-178.
107. Sueishi K, Hata Y, Murata T. Endothelial and glial cell interaction in diabetic retinopathy via the function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Pol J Pharmacol* 1996; 48(3):307-316.
108. Suto C., Kitano S. Hori S. An experimental model of intravitreal neovascularization in rabbits. *Acta Soc. Ophthalmol. Jpn.* 1992; 96:959-966.
109. Tallquist M, Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15:205-203.
110. Tamura M. Neovascularization in experimental retinal venous obstruction in rabbits. *Jpn J Ophthalmol* 2001; 45(2): 144-150.
111. Tano Y, Chandler D, Machemer R. Retinal neovascularization after intravitreal fibroblast injection. *Am J Ophthalmol* 1981; 92:103-109.
112. Tolentino MJ, Miller JW, Gragondas ES, Moulton R, Chatzistefanou K, Flynn E, Ferrara N, Adamis A. Vascular endothelial growth factor is

- sufficient to produce ocular neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995; 36:(suppl)402.
113. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, Flynn E, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. Ophthalmology 1996; 103:1820-1828.
114. Tolentino MJ, McLeod DS, Taomoto M, Otsuji T, Adamis AP, Luttjans GA. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the non-human primate. Am J Ophthalmol 2002; 133:373-385.
115. Tremblay C, Barza M, Szoka F, Lahav M, Baum J. Reduced toxicity of liposome-associated amphotericin B injected intravitreally in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci 1985; 26:711-718.
116. Sticks S, Koutsilieris M, Papapetropoulos A. Angiopoietins in angiogenesis and beyond. Expert Opin Investig Drugs 2003 12:933-941.
117. Viores SA, Youssri AI, Luna JD, Chen Y-S, Bhargava S, Viores MA, Schoenfeld C-L, Peng B, Chan C-C, LaRochelle W, Green WR, Campochiaro PA. Upregulation of vascular endothelial growth factor in ischemic and non-ischemic human and experimental retinal disease. Histol Histopathol 1997; 12:99-109.
118. Viridi PS., Hayreh SS. Ocular neovascularization with retinal vascular occlusion. Arch Ophthalmol 1982; 100:331-341.

119. Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Lactic acid oligomer microspheres containing hydrophilic drugs. *Pharm Sci.* 1990; 79:919-924.
120. Wald G. Molecular basis of visual excitation. *Science* 1968; 162:230
121. Wang Y, Gabrielsen A, Lawler PR. Myocardial gene expression of angiogenic factors in human chronic ischemic myocardium: influence of acute ischemia/cardioplegia and reperfusion. *Microcirculation* 2006; 13(3):187-197.
122. Warren RS, Yuan H, Matli MR. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* 1996; 271:29483–29488.
123. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83(3), 835-70.
124. Wise GN. Retinal neovascularization. *Trans Ophthalmol Soc* 1956; 54:729-826.
125. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22(1):1-29.
126. Yannuzzi LA, Negrão S, Iida T. Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina* 2001; 21(5):416-434.
127. Yasukawa T, Kimura H, Tabata Y, Ogura Y. Biodegradable scleral plugs for vitreoretinal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 2001; 52:25-36.

128. Yasukawa T, Ogura Y, Tabata Y, Kimura H, Widemann P, Honda Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* 2004; 23:253-281.
129. Zhou T., Lewis H., Foster RE., Schwendeman SP. Development of a multiple-drug delivery implant for intraocular management of proliferative vitreoretinopathy. *Journal of Controlled Release* 1998; 55:281-295.

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

**RABBIT RETINAL NEOVASCULARIZATION INDUCED BY LATEX
ANGIOGENIC DERIVED FRACTION: AN EXPERIMENTAL MODEL**

**RB Sampaio¹, RJ Mendonca², AR Simioni³, RA Costa⁴, RC Siqueira⁵; VM
Correa⁶, AC Tedesco³ A Haddad⁶, JC Netto², R Jorge¹**

**From the ¹Retina and Vitreous Section, Department of Ophthalmology,
School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão
Preto, SP, Brazil; ²Department of Biochemistry and Immunology, School of
Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo; ³Department of
Chemistry, School of Philosophy science of Ribeirão Preto, University of
São Paulo; ⁴U.D.A.T. – Macular Imaging & Treatment Division, Hospital de
Olhos de Araraquara, Araraquara, SP, Brazil; ⁵Retinal and Vitreous Section,
Hospital de Olhos de Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brazil;
⁶Department of Cellular and Molecular Biology and Pathogenic Agents;**

Correspondence to:

Prof. Dr. Rodrigo Jorge

Departamento de Oftalmologia, FMRP / USP

Avenida Bandeirantes 3900. Ribeirão Preto, SP 14049-900 BRAZIL

Telephone / Fax: 55(16) 3602-2523 / 3602-2860 E-mail: rjorge@fmrp.usp.br

Word count: 2317

ABSTRACT

Purpose: To create a retinal neovascularization experimental model using intravitreal injection of microspheres loaded with latex-derived angiogenic fraction (LAF). **Methods:** Thirty-two albino New Zealand rabbits, divided in 4 groups of 8 animals, were enrolled in this study. Group I, II and III rabbits received one intravitreal injection of PLGA (L-lactide-co-glycolide) microspheres with 10 μ g, 30 μ g and 50 μ g of LAF in their right eyes, respectively, and group IV received 0,1ml of microspheres without the angiogenic factor. Weekly follow-up with ophthalmoscopy and fluorescein angiography was performed, when the rabbits were sacrificed in the 4th week and their eyes processed for light microscopy. **Results:** All eyes from group I demonstrated retinal vascular tortuosity, associated with micro-hemorrhages, observed 14 days after injection, maintained for 28 days, otherwise without new vessels presence. All group II eyes showed vascular changes similar to group I. Fifty per cent of the eyes from group II rabbits developed retinal neovascularization 21 days after injection. All eyes from group III demonstrated important vascular tortuosity and retinal new vessels 2 weeks after injection, progressing to fibrovascular proliferation and tractional retinal detachment. No vascular changes or retinal new vessels were observed in group IV eyes. Light microscopy confirmed new vessels previously seen on fluorescein angiography, in retinal sections adjacent to the optic disc, not observed in sections at the same area in the control group. **Conclusion:** 30 and 50 μ g-microspheres containing latex angiogenic factor injected into the vitreous cavity induced experimental retinal neovascularization in rabbits.

Key-Words: angiogenesis; experimental model; latex; neovascularization; retinal vascular diseases; sustained release system; vascular endothelial growth factor (VEGF).

INTRODUCTION

Neovascularization in the retina occurs in several disease process, the most common of which is diabetic retinopathy, a major cause of new blindness in adults from developed countries ¹. Occlusion of retinal capillaries leading to retinal ischemia and consequent release of angiogenic factors is a feature shared by diseases in which retinal NV occurs ². To better understand this neovascularization process and in order to develop alternative therapeutic approaches, experimental models are necessary.

Retinal neovascularization in adult animals may be experimentally stimulated by LASER-induced venous thrombosis ^{3,4,5}, molecular biology and generation of transgenic animals over-expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) ⁶, fibroblast intravitreal injection ^{7,8}, or VEGF intravitreal sustained release ^{9,10}. Most of these methods require expensive equipments like Argon or diode LASER, or require expensive animals and/or techniques such as transgenic animals and intravitreal sustained release of VEGF.

Recently, an angiogenic fraction from Latex has been isolated by Coutinho-Neto and colleagues ¹¹. This fraction has presented angiogenic activity in chicken embryo and corneal pocket models ¹². New vessels developed 72 hours after a slow release device of LAF was placed on chorioallantoic membrane of chick embryos ¹¹ and 11 days after placement of the same device in rabbit corneas ¹².

Based on the above mentioned angiogenic properties, we designed the present study in order to develop a retinal neovascularization model in a highly accessible animal (New Zealand rabbit), using a low cost angiogenic factor, derived from the rubber tree: latex-derived angiogenic fraction (LAF).

MATERIAL AND METHODS

Latex preparation:

Natural latex was extracted from *Hevea brasiliensis* rubber tree. After rubber was separated from the other biological components, it was submitted to one purification step, by means of liquid chromatography. Three fractions were then obtained and evaluated for their vascular permeability capacity and angiogenesis induction. Results confirmed that latex-derived fraction 1 (LAF) demonstrated the highest activity among them¹¹, thus being used in this study.

Microspheres preparation:

Degradable poly (L-lactide-co-glycolide) (PLGA) copolymers composed of 50 mol % de L-lactide and 50 mol % de glycolide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were used to produce the LAF sustained delivery devices in the form of disposable microspheres, The polymeric devices were prepared by dissolving 0.31g of PLGA in 1.2ml of methylene chloride (Sigma-Aldrich). LAF specific quantity (10, 30 and 50µg) was dissolved in 1ml of saline solution that contained 27.9mg of bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) and 61 mg of poly(vinyl alcohol) (PVA; Sigma-Aldrich) or without LAF . This LAF solution was then added to the PLGA solution, emulsified using a vortex genie (firsher Scientific, Pittsburgh, PA) for 2 minutes, acquiring thus injectable dispositives, in three different concentration of 10, 30 or 50µg/0.1ml. LAF encapsulated in PLGA microspheres was injected into rabbits' vitreous cavities. Identical microspheres without LAF were made for control purposes.

Animals and intravitreal injection of slow release microspheres

Thirty-two female New Zealand albino rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) weighing approximately 2,5kg were used. The animals were treated in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) guidelines resolution regarding the use of animals in ophthalmic and vision research. The study was approved by the Ethics Committee for Animal

Experimentation of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. All procedures were performed in Experimental Surgery Rooms from School of Medicine of Ribeirão Preto Clinics' Hospital. The animals were kept in a quiet controlled environment, with free access to standard rabbit chow and water.

Anesthesia was induced by intramuscular injection of ketamine hydrochloride (50mg/kg, Ketalar[®]) and xylazine hydrochloride (4mg/kg, Coopazine[®], Schering-Plough Coopers, Brazil). During all procedures (as described below), anesthesia was maintained with continuous intravenous (IV) infusion of thiopental, if necessary, via a venous catheter inserted into the marginal ear vein. Pupils were dilated with 2,5% phenylephrine and 1% tropicamide drops. Before the injection of the microspheres, the ocular surface was anesthetized by topical instillation of proximetacaine 0,5% (Anestalcon[®], Alcon, Fort Worth, Texas, USA) and prophylactic antibiotic quinolone drops of 0,3% ofloxacin (Oflox[®], Allergan),

LAF microspheres were injected in the vitreous cavity using an insulin syringe equipped with a 26 gauge needle in the rabbits' right eyes, at a total volume of 0.1ml. Injections were performed 1mm posterior to the limbus. The rabbits were divided into 4 groups of 8 animals. Group I, II and III received microspheres with 10µg, 30µg and 50µg of LAF, respectively, and group IV received 0,1 ml of microspheres without the angiogenic factor. Ofloxacin (Oflox[®], Allergan) drops were used postoperatively, quid for five days, in the right eye.

Evaluation of animals by Indirect Ophthalmoscopy, Fundus Photography and Fluorescein Angiography:

Animals were anesthetized and pupils were dilated as described above for intravitreal injections. The rabbits were evaluated by indirect ophthalmoscopy, fundus photography and fluorescein angiography, performed before the microspheres injections and 7, 14, 21 and 28 days thereafter. For fluorescein

angiography, 1ml of 5% sodium fluorescein (Ophthalmos, São Paulo, Brazil) was injected in *bolus* via the marginal ear vein. Rabbits ocular fundus were then documented using a Topcon 50IA *fundus* camera (TOPCON 50IA, Tokyo, Japan).

Histopathologic Study

Sixteen rabbits posterior segments were used for histopathology study (4 from each group), and among them, eight (2 from each group) for semi-thin sections. The rabbits were killed by an intravenous overdose of thiopental in the 28^o day after the angiographic study. The experimental eyes were immediately enucleated and were hemisected 1mm posterior to the limbus, and their posterior segments processed for paraffin embedding, after fixation in 4% formaldehyde in 0.1M Sorensen's phosphate buffer, pH 7,2, for 24 hours, at 4^o C. Five-micron sections were cut using a microtome (Reichert- Jung, RM 2065 model, Leica Instruments[®], Germany). The sections were stained with hematoxylin and eosin prior to examination.

For studies using semi thin sections, the posterior segments of eight eyes were fixed in 2% formaldehyde plus 2% glutaraldehyde in 0,1M phosphate buffer, pH 7.2, for 4 hours, at 4^oC. After washing in buffer, small pieces were refixed in 1% osmium tetroxide in 0,1M phosphate buffer for 2 hours, at 4^oC. They were then dehydrated in graded ethanol, cleared in propylene oxide and embedded in Epon 812 resin. Semi thin sections (0.5 μ m) were stained with Toluidine blue for examination by light microscopy. Slides were photographed using a Digital Camera (Nikon DXM 1200, Japan).

Statistical Analysis

Descriptive analysis to describe the percentage of rabbits per group that developed retinal neovascularization.

RESULTS

No retinal malformation was observed at baseline in rabbits from all groups. One rabbit from group II and another from group IV died during the second week of the study and were excluded. One rabbit from group II and another from group III developed cataract during the first 2 weeks of the study and also were excluded. Dilation and mild hyperemia of conjunctival blood vessels were observed in all rabbits from groups I, II, and III, one week after injection. Six rabbits from group III persisted with conjunctival hyperemia till the fourth week of the study. Part of the microspheres remained localized in the mid vitreous cavity and did not deposit inferiorly in all groups (Figure 1). One animal from group I and another from group III persisted with significant vitreous opacity secondary to white microspheres deposits till week-4 and were excluded.

Group I (10µg/ml LAF)

All eyes (n=7) from this group showed retinal vascular dilation and tortuosity, associated with micro-hemorrhages extending from the retinal vessels, observed 14 days after intravitreal injection. These alterations maintained until fourth week and no new vessels were identified by clinical and angiographic examinations. Histopathology study with light microscopy, in retinal sections adjacent to the optic disc, did not reveal new vessels presence.

Group II (30µg/ml LAF)

All eyes (n=6) from this group showed vascular changes similar to group I, starting increasing dilation and tortuosity of retinal vessels about 7 days after injection. Fifty per cent of group II rabbits developed retinal neovascularization (NV) at the optic disc from 21 days after injection, leading to tractional retinal detachment in the fourth week (Figure 1). Large retinal vessels remained dilated and there were many smaller vessels on and around the optic disc, suggestive of new vessels, since they were not in a position normally occupied by retinal

vessels and they appeared to extend toward the microspheres deposit (Figure 1). Fluorescein angiography (performed 21 days after microspheres injection) demonstrated typical progressive hyperfluorescence secondary to leakage of fluorescein from retinal vessels at the disc. Light microscopy of retinal sections adjacent to the optic disc from eyes 28 days after LAF injection confirmed fluorescein angiography findings regarding optic disc neovascularization.

Group III (50µg/ml LAF)

All eyes (n=6) from this group developed important vascular dilation and tortuosity and retinal new vessels 2 weeks after injection, progressing to tractional retinal detachment 3 weeks after. Fluorescein angiography 2 weeks after injection showed progressive increase of fluorescence from new vessels at the disc. Light microscopy confirmed fluorescein angiography findings regarding new vessels, showing the presence of a fibrovascular tissue between the optic nerve and the microspheres deposit (Figure 2B). On higher magnification of this intervening tissue, numerous small blood vessels under development were verified (Figure 2C).

Group IV (control)

Microspheres without LAF were injected into the vitreous cavity of right eyes' rabbits (n=7). As already mentioned above, no vascular changes or retinal new vessels were observed in this group, at any study period. Light microscopy confirmed fluorescein angiography findings regarding the absence of retina new vessels (Figure 2A).

DISCUSSION

In this study, it was demonstrated that sustained release of LAF into the rabbits' vitreous cavity provokes retinal new vessels, leading to fundoscopic alterations similar to that induced by VEGF⁹. Although LAF levels were not measured, the highest rate of retina new vessels development occurred in group

III, whose rabbits received 50 µg of LAF intravitreally. This result suggests that high concentrations of the LAF are necessary to develop rabbit retinal NV, as also reported for VEGF^{9,10}.

NV verified in this rabbit model of neovascularization occurred around the optic disc, as already reported by other investigators⁹. Rabbit retinal vessels are localized along the medullary ray and in direct contact to the posterior vitreous¹³. This anatomic feature allows a direct exposure to drugs and factors injected in the vitreous, differently from primate and human retinas, where the vessels are found inside retinal layers. Since then, we assume that rabbit retinal is more prone to new vessels development induced by intra-vitreous drugs and factors, as verified in the present study. Other advantages from the present model includes the relatively low cost and accessibility of rabbits compared to primates and pigs, and the size of rabbit eyes, which is sufficiently large to allow intraocular injection of drugs and assessment of response by ocular *fundus* photography¹⁴.

The characterization of new vessels only by histopathology study may be dubious. However, the typical histology findings of new vessels under formation (Figure 2C) in a normally avascular region (anterior optic disc space), allied to fluorescein progressive leakage in angiography studies are irrefutable regarding neovascularization development.

On the other hand, the nature of the stimulus remains to be determined, since a specific factor was not purified. In addition, the present study did not look for differentiation between inflammatory foreign body reaction versus a purely angiogenic stimulus. Some remarks are, however, pertinent: 1) In a skin regeneration model, LAF seems to stimulate production of interleukin-10, which has anti-inflammatory properties¹⁵; 2) in the corneal pocket model of neovascularization, pure vulcanized rubber was placed on the corneal center in control group rabbits, and no new vessels developed, what flaws the foreign body reaction theory¹² and 3) although conjunctival hyperemia was noted in 6 rabbits from group III during all study period, there was no important inflammatory haze and this conjunctival sign may be related to chronic tractional

retinal detachment. To address this issue, pilot studies will be performed with the present neovascularization model using bevacizumab or triamcinolone as anti-angiogenic drugs.

This model herein developed is relatively inexpensive since the angiogenic fraction is obtained from a substance found in abundance in the Brazilian territory: the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) latex. The cost for obtaining one LAF microgram ranges from 25 to 50 times less than the same for VEGF. Therefore, this model is accessible to developing countries, allowing anti-angiogenic drugs studies, which could collaborate in the field of the two major retinal blinding causes in the world: Diabetic Retinopathy and Age Related Macular Degeneration.

REFERENCES

130. Klein R, Klein BE, Moss SE. Visual impairment in diabetes. *Ophthalmology* 1984; 91:1-9.
131. Boulton M, Foreman D, Williams G, et al. VEGF localization in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 1998; 82:561-568.
132. Hamilton A, Marshall J, Kohner E, et al. Retinal new vessel formation following experimental vein occlusion. *Exp Eye Res* 1975; 20:493-497.
133. Pournaras CJ, Tsacopoulos M, Strommer K, et al. Experimental retinal branch vein occlusion in miniature pigs induces local tissue hypoxia and vasoproliferative microangiopathy. *Ophthalmology* 1990a; 97:1321-1328.
134. Danis R, Yang Y, Massicotte S, et al. Preretinal and optic nerve head neovascularization induced by photodynamic venous thrombosis in domestic pigs. *Arch Ophthalmol* 1993; 111:539-543.
135. Okamoto N, Tobe T, Hackett S, et al. Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol* 1997; 151:281-291.
136. Tano Y, Chandler D, Machemer R. Retinal neovascularization after intravitreal fibroblast injection. *Am. J. Ophthalmol.* 1981; 92:103-109.
137. Hannekan A, Li J, Ray J, et al. Overexpression of recombinant basic FGF induces massive preretinal neovascularization in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:1024.

138. Ozaki H, Hayashi H, Viores SA, et al. Intravitreal Sustained Release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates. *Exp Eye Res* 1997; 64:505-517.
139. Alikacem N, Yoshizawa T, Nelson KD, et al. Quantitative MR imaging study of intravitreal sustained release of VEGF in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1561-1569.
140. Mendonça, RJ. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Riberão Preto. (2004); 94 f.
141. Mrué F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. Tese (Doutorado em medicina) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2000
142. Prince JH. The rabbit in eye research. Thomas CC publisher USA 1964.
143. Miller J W. Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization. *Am. Journal of Pathology* 1997;151(1):281-291.
144. Lamounier FMC. Avaliação da produção de citocinas inflamatórias in vitro, induzidas pela biomembrana do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em dermatologia) – Faculdade

de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão
Preto. 2004

FIGURES

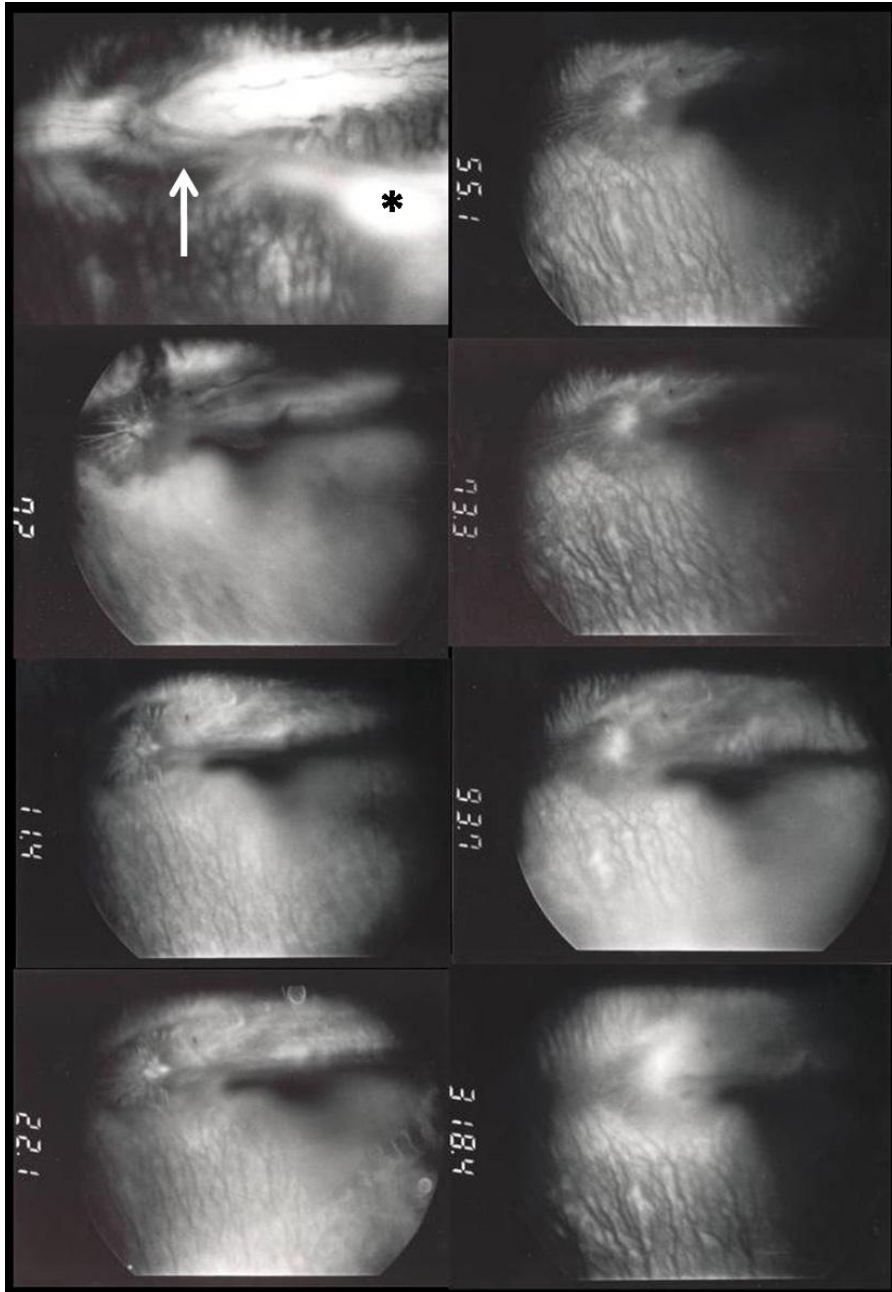


Figure 1

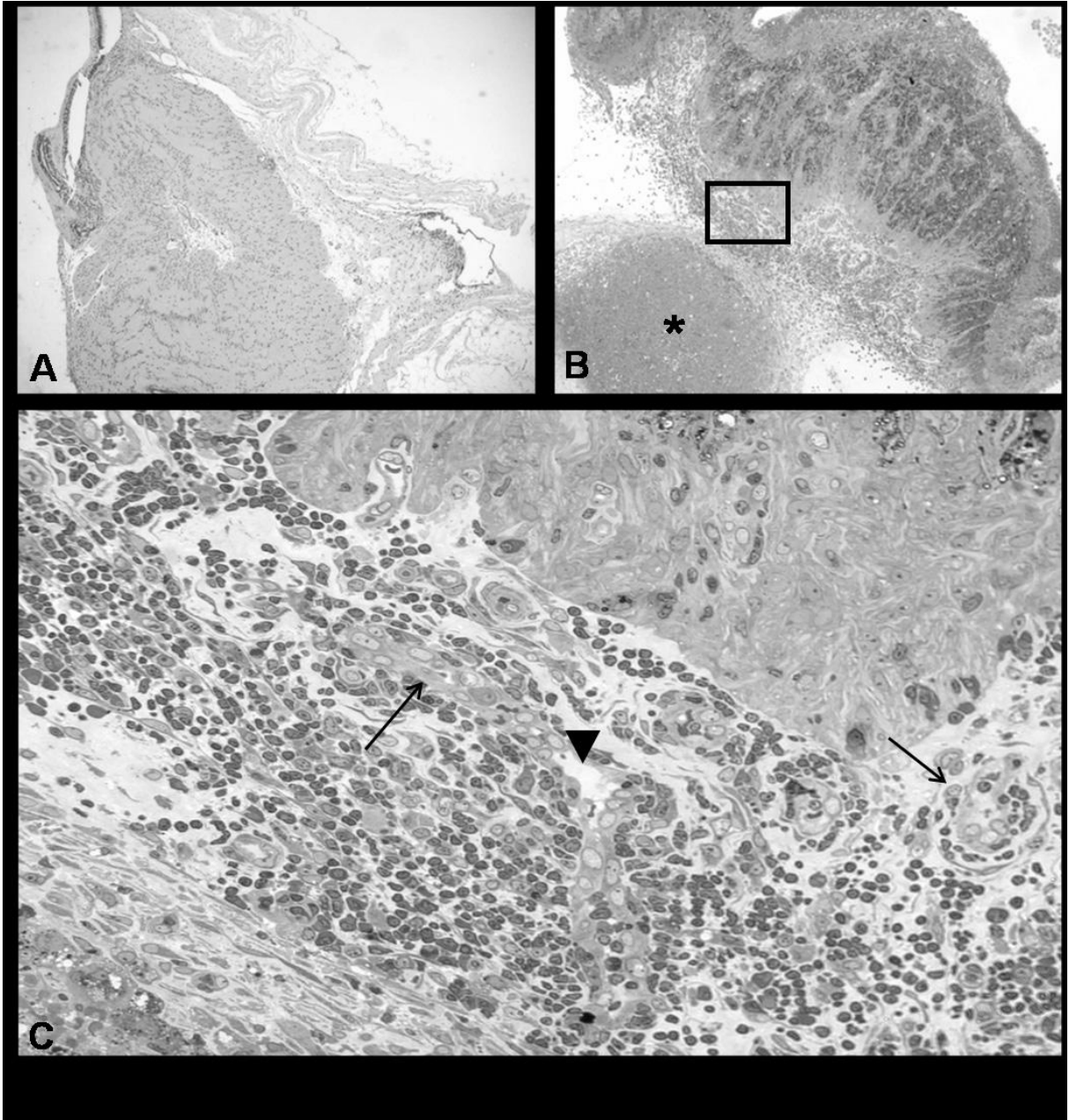


Figure 2

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Fluorescein Angiography pictures 21 days after LAF intravitreal injection (30µg/0,1ml). Top left: red free picture before injection showing long-lasting microspheres deposits anterior to the optic disc (asterisk) and the fibrovascular tissue formation in the direction of the deposits (white arrow). After 7,2 seconds, fluorescein reaches the retinal arterioles and subsequently there is progressive disc hyperfluorescence secondary to fluorescein leakage from new vessels anterior to the optic disk.

Figure 2. Photomicrographs of the posterior segment of the eye from Group IV (A) and group III (B,C) rabbits. (A) Paraffin section stained with H.E. The head of the optic nerve fills up most of the area of the picture and exhibits morphological features comparable to normal animals. At the superior left side, it is visualized the retina, artificially detached due to an artifact of the histological technique (x 40). (B). Semi thin (0,5µm thick) resin section stained with toluidine-blue, showing optic nerve head. The dark aspect is secondary to osmium tetroxide fixation by myelin sheath from optic nerve axons. Adjacent to the optic nerve head, there is a fibrovascular tissue with plenty conglomerates of immature endothelial cells, better visualized in (C). Asterix indicates a chronic inflammatory reaction secondary to microspheres vitreous deposition. Of note is the development of the neovascular tissue between the optic nerve head and the microspheres vitreous deposits (x 40). (C) Magnification of the area inside the rectangle in (B). The newly formed tissue is closely attached to the head of the optic nerve. The numerous small free cells are the tantamount of a lymphocyte infiltrate whereas the conglomerates marked with an arrow indicate blood vessels under formation. Arrow head indicates new vessel lumen (x 200).