



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GERSON JORGE APARECIDO LOPES

**EFEITOS DO USO TÓPICO E SUBCONJUNTIVAL DO
BEVACIZUMABE (AVASTIN®) NA SUPERFÍCIE OCULAR
ÍNTEGRA E NA NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEANA DE
OLHOS DE COELHOS**

Londrina
2008

GERSON JORGE APARECIDO LOPES

**EFEITOS DO USO TÓPICO E SUBCONJUNTIVAL DO
BEVACIZUMABE (AVASTIN®) NA SUPERFÍCIE OCULAR
ÍNTEGRA E NA NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEANA DE
OLHOS DE COELHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcelo Barbante
Casella.

Londrina
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

L864e

Lopes, Gerson Jorge Aparecido.

Efeito do uso tópico e subconjuntival do *Bevacizumabe* (avastin®) na superfície ocular íntegra e na Neovascularização corneana de olhos de coelho. / Gerson Jorge Aparecido Lopes. - Londrina, 2008.

xiii, 85 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Antonio Marcelo Barbante Casella.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciência da Saúde, 2008.

Bibliografia: f. 39-43.

1. Neovascularização. 2. Córnea. 3. *Bevacizumabe*. 4. Toxicidade I. Casella, Antonio Marcelo Barbante. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU: 617.719

GERSON JORGE APARECIDO LOPES

**EFEITOS DO USO TÓPICO E SUBCONJUNTIVAL DO
BEVACIZUMABE (AVASTIN®) NA SUPERFÍCIE OCULAR ÍNTEGRA
E NA NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEANA DE OLHOS DE
COELHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Marcelo Barbante Casella
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Milton Ruiz Alves
USP – Cerqueira Cesar – SP

Prof. Dr. Guilherme Herzog Neto
FIOCRUZ – Rio de Janeiro – RJ

Profa. Dra. Rosemeire Albuquerque Pontes
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Marco Aurélio de Freitas Rodrigues
UEL – Londrina - PR

Londrina, 9 de abril de 2008.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai que me ensinou a valorizar o estudo,
mesmo não o tendo por completo.

À minha mãe, pelo amor incondicional.

À Heloíza, por estar sempre presente.

Aos meus filhos e filhas, por proporcionarem-me um
aprendizado constante.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Antônio Marcelo Barbante Casella**, pelo estímulo e exemplo de perseverança na contínua busca do conhecimento.

À **Prof^a. Ms. Ana Paula Oguido**, pela imprescindível ajuda durante todo o experimento.

Ao **médico veterinário Dr. Donizete Rodrigues Belitardo**, responsável pelo Biotério do CCS, pelo apoio e, principalmente, pelo profissionalismo no trato com os animais.

À **Prof^a. Dr^a. Tiemi Matsuo**, docente do Departamento de Matemática Aplicada da Universidade Estadual de Londrina, pela contribuição na análise estatística e nas inúmeras orientações ao longo do trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Profª. Ms. Marina Okuyama Kishima**, professora de anatomia-patológica, pela colaboração e orientação imprescindíveis no estudo histopatológico.

Aos **colegas do Setor de Oftalmologia** do Departamento de Clínica Cirúrgica da Universidade Estadual de Londrina, pela colaboração nos meus dias de ausência.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Thomson, Ex-Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Estadual de Londrina, pela compreensão e apoio.**

À **Profª. Drª. Ana Maria Bonametti**, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Estadual de Londrina pelo apoio e disponibilidade constante.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Pinto**, professor do curso de Odontologia da UEL, que não hesitou em ceder equipamento e pessoal para a documentação fotográfica.

Ao **Prof. Dr. Glaikon Alex Stabile** e aos residentes de Odontologia, **Darwin Gutterres e Kizzy Santos Fernandes**, que prontamente auxiliaram no registro fotográfico.

À **Profª. Alda Fiorina Maria L. Guembarovski**, professora de anatomia-patológica, pela colaboração nas horas em que precisei.

À **Dra. Dora Grimaldi**, médica patologista, pela orientação objetiva.

À Documentação Científica de Hospital Universitário de Londrina, em especial ao **Fotógrafo Frasnny C. Marcelino**, pela disponibilidade de trabalho.

Ao primo e amigo **Ricardo Bottino** pelos esclarecimentos precisos.

À **Maria Emília**, responsável pelo Laboratório de Pós-Graduação, pela disponibilidade dos recursos laboratoriais que se faziam necessários.

À **Ana Esmeralda Carelli e Ivone Guerreiro Di Chiara**, docentes do Curso de Ciências da Informação, pelos esclarecimentos na elaboração do trabalho.

À **Teresa**, secretária do Departamento de Clínica Cirúrgica, pela constante disponibilidade e ajuda.

LOPES, G. J. A. **Efeitos do uso tópico e subconjuntival do Bevacizumabe (Avastin®) na superfície ocular íntegra e na neovascularização corneana de olhos de coelhos.** 2008. 85 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2008.

RESUMO

Introdução: A experimentação do bevacizumabe (Avastin®) para uso tópico e subconjuntival no olho é oportuna diante das inúmeras situações em que a inibição do crescimento de neovasos na superfície ocular é desejável. Para tanto, é necessário submeter esta droga a um teste de irritação ocular e observar sua eficácia na neovascularização corneana.

Objetivos: Avaliar a toxicidade do uso tópico e da injeção subconjuntival do bevacizumabe (Avastin®) na superfície ocular íntegra de olhos de coelhos; avaliar e comparar o efeito do uso tópico e da injeção subconjuntival do bevacizumabe (Avastin®) na neovascularização corneana de olhos de coelhos após queimadura química.

Materiais e Métodos: Estudo experimental em 60 coelhos. O experimento foi realizado em três etapas. A primeira e a segunda etapa avaliaram a toxicidade do Avastin® para a superfície ocular sadia, através da instilação e da injeção subconjuntival da droga, respectivamente. A terceira etapa observou o efeito do bevacizumabe na neovascularização corneana após queimadura. Nas etapas 1 e 2 foi realizado exame externo do olho e o estudo histopatológico da conjuntiva e córnea. Na terceira etapa a neovascularização foi avaliada conforme o tamanho dos neovasos e com análise computadorizada da área neovascularizada de cada córnea. Na análise de dados aplicou-se o teste de Mann-Whitney para comparar o exame externo e a contagem das células inflamatórias em todos os tempos das etapas 1 e 2; quanto à etapa 3, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn com $p < 0,05$ para comparação dos grupos dois a dois na análise do exame externo da neovascularização corneana. Na análise da área de neovascularização corneana, aplicou-se o teste F de análise de variância. A significância estatística foi definida como valor de $p < 0,05$.

Resultados: Na etapa 1, o escore mediano do exame externo e da contagem de células inflamatórias, após os tempos de instilação do soro fisiológico e do Avastin®, não apresentou diferença significativa. Na etapa 2, o escore mediano do exame externo e da contagem de células inflamatórias, após os tempos de injeção do soro fisiológico e do Avastin®, não apresentou diferença significativa, com exceção do número de células inflamatórias na conjuntiva no primeiro dia. Na etapa 3, nas comparações dos grupos dois a dois não foram detectadas diferenças significativas, porém, ao analisar os fatores envolvidos (procedimentos: injeção ou instilação, e as drogas: Avastatin® ou soro fisiológico), verificou-se que a injeção não diferiu da instilação, mas o Avastin® diferiu do soro fisiológico.

Conclusão: Não houve toxicidade com o uso tópico e com a injeção subconjuntival do bevacizumabe (Avastin®) na superfície ocular íntegra (conjuntiva e córnea) de olhos de coelhos; o bevacizumabe (Avastin®) apresentou efeito inibitório na neovascularização corneana de olhos de coelhos após queimadura química, tanto por via tópica como por via subconjuntival e não houve diferença entre a via tópica e a via subconjuntival de administração do bevacizumabe (Avastin®) na inibição da neovascularização corneana.

Palavras Chaves: Neovascularização. Córnea. *Bevacizumabe* (Avastin®). Toxicidade.

LOPES, G. J. A. **The Effects of topical and subconjunctival use of Bevacizumab (Avastin®) on the ocular surface and in the corneal neovascularization of rabbit eyes.** 2008. 85p. Thesis. State University of Londrina. Londrina. 2008.

ABSTRACT

Introduction: Experimentation with bevacizumab (Avastin®) for topical and subconjunctival use on the eye is relevant considering the several situations in which the inhibition of the growth of new blood vessels on the surface of the eye is desirable. Therefore, it is necessary an eye irritant test of this drug and the evaluation of the drug effects on experimental corneal neovascularization.

Objectives: To evaluate the toxicity of the topical use and subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin®) on the entire surface of rabbit eyes; to evaluate and compare the effect of the topical use and the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin®) on corneal neovascularization of rabbit eyes after chemical burns.

Materials and Methods: Experimental study on the eyes of 60 rabbits. The experiment was carried out in three steps. The first and second steps evaluated the toxicity of Avastin® on the healthy ocular surface through the instillation and the subconjunctival injection of the drug and of normal saline solution. The third step observed the effect of bevacizumab on corneal neovascularization after chemical burn.

In steps 1 and 2, an external exam of the eye and the histopathological study of the conjunctiva and cornea were carried out. In the third step neovascularization was evaluated according to the size of the new blood vessels and computerized analysis of the area of neovascularization. The Mann-Whitney test was applied to the data to compare the external exam and the inflamed cell count at all points of steps 1 and 2. In step 3, the Kruskal-Wallis test was applied, followed by the Dunn test with $p < 0.05$ for comparison with the groups two by two in the external exam of corneal neovascularization. In the analysis of the area of corneal neovascularization, the F test of variance analysis was applied. P value < 0.05 was considered statistically significant.

Results: In step 1, median score of the external exam and the inflamed cell count after the instillation of normal saline solution and of Avastin® did not present a significant difference. In step 2, the median score of the external exam and the inflamed cell count after the injection of normal saline solution and of Avastin® did not show a significant difference, except in the number of inflamed cells in the conjunctiva on the first day. In the third step, in comparisons of the groups two by two, there were not significant differences, although upon analyzing the factors involved (procedures: injection or instillation, and the drugs: Avastin® or normal saline solution) it was verified that injection did not differ from instillation, but Avastin® differed from normal saline solution.

Conclusion: There was no toxicity in the topical use or in the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin®) on the surface of the rabbit eyes (conjunctive and cornea). Bevacizumab (Avastin®) showed inhibitory effect on corneal neovascularization in rabbit eyes after chemical burn and there was no difference between the topical or subconjunctival administration of bevacizumab (Avastin®) in the inhibition of corneal neovascularization.

Key-words: Corneal neovascularization. Toxicity. *Bevacizumab* (Avastin®).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esquema de instilação e injeção do SF e do Avastin® (A).....	26
Quadro 2. Esquema de injeção e instilação da droga Avastin® (A) e do SF após a queimadura corneana.....	29
Quadro 3. Escala de graduação dos efeitos das substâncias nas estruturas oculares	30
Quadro 4. Escala de graduação da neovascularização corneana.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise estatística do resultado da avaliação do exame externo dos olhos dos coelhos, pela escala de graduação dos efeitos oculares, de acordo com o tempo transcorrido após a instilação do SF e do Avastin®	35
Tabela 2 - Análise estatística do resultado da contagem de células inflamatórias realizada na conjuntiva e na córnea dos olhos dos coelhos, de acordo com o tempo transcorrido após a instilação do SF e do Avastin®	36
Tabela 3 - Análise estatística do resultado da avaliação do exame externo dos olhos dos coelhos, pela escala de graduação dos efeitos oculares, de acordo com o tempo transcorrido após injeção do SF e do Avastin®	38
Tabela 4 - Análise estatística do resultado da contagem de células inflamatórias na conjuntiva e na córnea dos olhos dos coelhos, de acordo com o tempo após a injeção do SF e do Avastin®	39
Tabela 5 - Resultado da avaliação do exame externo da neovascularização dos olhos dos coelhos no 5º dia e 10º. dia de observação.....	41
Tabela 6 - Análise estatística do resultado da avaliação do exame externo e da área de neovascularização dos olhos dos coelhos no 5º dia e 10º. dia de observação	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AV	Avastin®
CCS	Centro de Ciências da Saúde
FDA	Food and Drug Administration
Kg	Quilograma
NVC	Neovascularização
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
OD	Olho direito
OE	Olho esquerdo
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
pH	Potencial hidrogeniônico
SF	Soro fisiológico 0,9%
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UEM	Universidade Estadual de Maringá
USP	United States Pharmacopeia
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
μ	micra
>	maior
<	menor
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A Superfície Ocular	14
1.2	Teste de Irritação Ocular	15
1.3	Angiogênese	17
1.3.1	Fator de crescimento endotelial vascular	19
1.4	Bevacizumabe	20
2	OBJETIVOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Período e Local do Estudo	23
3.2	Delineamento do Estudo	23
3.3	Amostra	23
3.4	Ambiente de Experimentação	23
3.5	Avastin®	24
3.6	Definição dos Grupos	24
3.7	Etapas Experimentais	25
3.7.1	Etapa 1	25
3.7.2	Etapa 2	27
3.7.3	Etapa 3	27
3.8	Métodos de Aferição	29
3.8.1	Exame da conjuntiva, córnea e íris	29
3.8.1.1	<i>Avaliação com microscópio cirúrgico</i>	29
3.8.1.2	<i>Estado epitelial</i>	30
3.8.1.3	<i>Análise histopatológica</i>	30
3.8.1.4	<i>Neovascularização corneana</i>	31
3.9	Estudo Piloto	32
3.10	Análise dos Dados	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Uso Tópico do Avastin® (Etapa 1)	34
4.1.1	Exame da conjuntiva, córnea e íris	34

4.1.2	Contagem de células inflamatórias na conjuntiva e córnea	34
4.1.3	Análise dos dados.....	34
4.2	Injeção Subconjuntival do Avastin® (Etapa 2)	37
4.2.1	Exame da conjuntiva, córnea e íris.....	37
4.2.2	Contagem de células inflamatórias na conjuntiva e córnea	37
4.2.3	Análise dos dados.....	37
4.3	Efeito do Uso Tópico e Subconjuntival do Avastin® na Neovascularização Corneana (Etapa 3)	40
4.3.1	Análise dos dados.....	42
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	BIBLIOGRAFIA	54
	APÊNDICES	55
	APÊNDICE A - Tabelas mostrando os resultados obtidos nas diversas fases do experimento, etapa 1 e 2.....	56
	APÊNDICE B - Escala de graduação dos efeitos oculares para anotação pelo examinador, etapa 1 e 2.....	61
	APÊNDICE C - Escala de graduação dos efeitos oculares para anotação pelo examinador, etapa 3	62
	APÊNDICE D - Escala de graduação do grau de neovascularização para anotação pelo examinador	63
	APÊNDICE E - Esquema elaborado para o examinador desenhar a neovascularização corneana	64
	APÊNDICE F - Fotos ilustrativas de alguns olhos dos coelhos da etapa 1	65
	APÊNDICE G - Fotos do exame histopatológico da conjuntiva e da córnea, etapa 1 e 2.....	67
	APÊNDICE H - Fotos ilustrativas do ambiente de experimentação e da etapa 3	71

1 INTRODUÇÃO

A experimentação do bevacizumabe (Avastin®) para uso tópico no olho é oportuna diante das inúmeras situações em que a inibição do crescimento de neovasos na superfície ocular é desejável.

Angiogênese é a formação de um novo vaso sanguíneo a partir de um já existente (Ferrara, 2002; Gupta, Zhang, 2005; van Wijngaarden et al., 2005; Erdurmus et al., 2007) e depende do delicado balanço entre os fatores que promovem o crescimento vascular (como o VEGF e o fator familiar de crescimento de fibroblastos) e os fatores inibitórios do crescimento vascular (como o trombospondin, angiostatin e endostatin) ao redor do endotélio (Gupta, Zhang, 2005; van Wijngaarden et al., 2005). Um dos mais específicos fatores regulatórios é o VEGF, que regula a proliferação, a permeabilidade e a sobrevivência endotelial (Gupta, Zhang, 2005; van Wijngaarden et al., 2005).

A neovascularização corneana é uma resposta da córnea a agressões e inflamação na tentativa de facilitar a resolução de um processo patológico. A presença de neovasos leva à perda da transparência da córnea e, conseqüentemente, compromete a visão, sendo importante adotar medidas, sempre que possível, para diminuir a inflamação e impedir o crescimento de novos vasos sanguíneos na córnea (Mahoney, Waterbury, 1985; Riazi-Esfahani et al., 2006; Erdurmus et al., 2007). O tratamento da NVC corneana é difícil e pouco efetivo (Cole et al., 2007). Uma das opções é o uso de corticosteróides, que possuem uma ação antiinflamatória e não especificamente antiangiogênica (Cole et al., 2007), mas nem sempre são efetivos (Manzano et al., 2007). Várias drogas já foram investigadas experimentalmente sem, contudo, demonstrarem um resultado ideal, como a indometacina (Deutsch, Hughes, 1979), ciclosporina (Lipman et al., 1992), extrato aquoso de própolis (Hepsen et al., 1999), plasminogênio (Zhang et al., 2005), triamcinolona e doxiciclina (Riazi-Esfahani et al., 2006) e timoquinona (Erdurmus et al., 2007), não havendo consenso sobre o melhor tratamento da NVC da córnea (Hosseini et al., 2007). As investigações continuam no intento de identificar uma droga que impeça o crescimento de neovasos na córnea.

O Avastin® é uma droga antiangiogênica utilizada para câncer metastático de cólon e foi o primeiro inibidor de angiogênese a prolongar a sobrevida de pacientes em um estudo clínico controlado. Foi aprovado pelo FDA em fevereiro de 2004 para uso nestes casos, por via sistêmica (Zondor, Medina, 2004; Folkman, 2004; Gupta, Zhang, 2005). Esta droga também foi administrada por via intra-ocular, uso *off-label*, em algumas alterações que

comprometem camadas internas do olho (coróide e retina), como a degeneração macular relacionada à idade, a oclusão venosa central e a retinopatia diabética (Ferrara, 2002; Folkman, 2004; Michels et al., 2005; Rosenfeld et al., 2005; Feiner et al., 2006). A experiência do uso do Avastin® na superfície ocular em doenças conjuntivais e corneanas ainda precisa ser avaliada por ensaios clínicos controlados.

As substâncias químicas, naturais ou sintéticas, podem determinar alterações funcionais e orgânicas mais ou menos graves em qualquer indivíduo, conforme a natureza da substância, sua concentração e, principalmente, a sensibilidade do indivíduo ou de um de seus órgãos (Maffei, 1978). Por isso, toda substância para uso na superfície do olho deve passar por um teste de irritação ocular, com o propósito de verificar sua toxicidade. Não se encontraram na literatura trabalhos que mostrassem a realização do teste de irritação ocular para o Avastin®, apesar de haver evidências de que não houve dano ocular em trabalhos que usaram esta droga topicamente e por via subconjuntival (Barros, Belfort Junior, 2007; Manzano et al., 2007; Yoeruek et al., 2007).

Este trabalho analisa clinicamente e histologicamente a toxicidade do uso tópico e da injeção subconjuntival do bevacizumabe na superfície ocular íntegra (conjuntiva e córnea), bem como o seu efeito na neovascularização corneana após queimadura em olhos de coelhos.

1.1 A Superfície Ocular

A superfície ocular engloba a conjuntiva, a córnea e o limbo, bem como o filme lacrimal que tem uma relação metabólica fundamental com estas estruturas (Gomes, Pires, 2002). Estas três estruturas são revestidas por um epitélio do tipo pavimentoso estratificado não-queratinizado sobre uma membrana basal composta por colágeno e proteínas da matriz extracelular. As funções básicas deste epitélio são: compor uma superfície lisa e regular junto com o filme lacrimal; servir de barreira de proteção e providenciar mecanismos cicatriciais ante agressões externas (Gomes, Pires, 2002; Gomes, Gueiros, 2003).

A conjuntiva é uma membrana mucosa extremamente fina e transparente que recobre toda a superfície posterior das pálpebras, reflete sobre si mesma (fórnice ou fundo de saco) e se estende por toda a face anterior do olho com exceção da córnea. A porção que cobre o tarso é chamada de conjuntiva tarsal ou palpebral, enquanto que a porção que recobre a esclera é denominada conjuntiva bulbar (Dantas, 1980). O epitélio da conjuntiva é formado por um conjunto de seis a nove camadas de células epiteliais. Caracteristicamente 7% da

população de células basais correspondem a células caliciformes secretoras de mucina. O estroma conjuntival é formado por tecido conjuntivo frouxo com vasos sanguíneos, linfáticos e células como linfócitos, mastócitos, plasmócitos e neutrófilos (Hogan et al., 1971; Gomes, Pires, 2002).

A córnea é transparente, avascular e rica em terminações nervosas. A manutenção de sua transparência é fundamental, pois ela é a principal superfície refrativa do olho (Power, Neves, 1996). Compõe, juntamente com a esclera, a túnica externa ocular, e corresponde a 20% desta. Possui cinco camadas: epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. O epitélio é do tipo pluriestratificado não-ceratinizado e possui uma camada basal unicelular (células cilíndricas), uma camada intermediária e uma camada superficial com células achatadas em espessura. Linfócitos e macrófagos são encontrados ocasionalmente na camada basal e intermediária (Boteon, Ferreira Filho, 2007). O estroma possui ceratócitos, a matriz extracelular (composta por fibras colágenas e substância fundamental) e linfócitos, macrófagos e raros leucócitos polimorfonucleares (Hogan et al., 1971).

1.2 Teste de Irritação Ocular

A inflamação é um mecanismo de defesa contra agentes agressores. A principal característica da inflamação é a reação dos vasos sanguíneos com acúmulo de líquido e leucócitos no tecido extracelular. A inflamação pode ser aguda ou crônica. A aguda inicia-se rapidamente e pode durar de alguns minutos até dias. Durante o processo inflamatório ocorre exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos (Contran et al., 1994).

Medicações oftálmicas tópicas produzem alta concentração na córnea e conjuntiva e podem causar danos epiteliais nestas estruturas; os veículos e preservativos destas drogas também podem exercer efeitos danosos para o epitélio corneano e conjuntival (Burstein, 1980). Uma das técnicas de avaliação da citotoxicidade das drogas é o teste em animais. Os testes em animais costumam preceder os ensaios clínicos em humanos (Gupta, Schiavo, 1976). O teste mais comum, usado para avaliar a agressão ou segurança de alguma substância para uso no olho ou próximo do olho (como preparações oftálmicas ou cosmético), é o teste de irritação ocular em coelhos, denominado “The Draize Eye Test” (Burstein, 1980;

Chambers et al., 1993; Wilhelmus, 2001). O propósito deste teste é fornecer informações sobre a possibilidade do material testado agredir o olho humano (Chambers et al., 1993).

O olho de coelho em geral é mais sensível à irritação química do que o olho de primatas, incluindo-se o homem (Carpenter, Smith, 1946). Em contrapartida, o olho humano é mais sensível do que o olho de coelho a alguns produtos, citando-se, como exemplo, alguns agentes preservativos usados em drogas oftálmicas (Chambers et al., 1993). Para que possa haver uma interpretação dos testes em animais e a relação destes com a resposta humana a drogas e preservativos é necessária a adoção de uma escala padronizada (Burstein, 1980).

O teste de irritação ocular “The Draize Eye Test” é utilizado para avaliar a irritação potencial de uma substância para o olho (Chambers et al., 1993). Este teste possui um protocolo-padrão para substâncias instiladas na córnea e na conjuntiva de olhos de animais. Os parâmetros-chaves são o número de animais utilizado, a dose e duração da exposição à substância testada. O número de animais depende dos objetivos estipulados e geralmente é usado um grupo de três a seis animais (Chambers et al., 1993; Springer et al., 1993; Wilhelmus, 2001). Quanto às preparações, os líquidos são os mais comumente usados, entretanto pomadas, pastas e substâncias sólidas também podem ser testadas (Wilhelmus, 2001).

A avaliação dos efeitos provocados geralmente é subjetiva e está sujeita à variabilidade entre observadores e laboratórios de pesquisa. Os principais critérios observados são a severidade da reação ocular, o número de animais que apresentaram reação, o tempo de início e a duração das manifestações. A observação pode ser feita a olho nu, mas instrumentos de magnificação como lupa ou microscópio são preferencialmente usados. Pode-se ainda utilizar a coloração com colírio de fluoresceína e a fotodocumentação (Chambers et al., 1993; Springer et al., 1993; Wilhelmus, 2001).

O foco do teste de irritação ocular é avaliar os efeitos na mucosa e no epitélio. O efeito tóxico sistêmico geralmente não é o objetivo investigado, mas qualquer alteração neste sentido deve ser registrada (Wilhelmus, 2001).

O período de observação varia de uma hora a três dias, podendo chegar a sete dias (Wilhelmus, 2001).

O “Draize Eye Test” observa alterações na conjuntiva, córnea e íris. O resultado é registrado por um escore gradativo (Quadro 3). Os parâmetros mais importantes são aqueles que podem causar um dano ocular ou comprometimento da visão, por exemplo a

inflamação da íris indica um dano ocular e a opacidade da córnea reduz a visão. Já a reação conjuntival pode significar um dano para o olho ou apenas uma irritação ocular. Chambers et al. (1993) consideram que até mesmo situações de estresse podem desencadear certo grau de vermelhidão conjuntival sem que traduza um dano ocular. O teste é considerado positivo quando um animal apresenta, em algum momento do exame, opacidade corneana ≥ 1 , irite ≥ 1 e vermelhidão ≥ 2 . O Comitê Econômico Europeu considera o teste positivo se, num teste com três coelhos, um deles apresenta um escore médio (nos três dias de observação) de opacidade corneana ≥ 2 , irite ≥ 1 ou vermelhidão conjuntival $\geq 2,5$, isoladamente ou em conjunto (Chambers et al., 1993; Springer et al., 1993).

Dependendo do resultado final, a substância pode ser classificada como não-irritante, moderadamente irritante, irritante (danosa) ou corrosiva. Este extremo corresponde a alterações oculares irreversíveis (Wilhelmus, 2001). Presume-se que a substância é irritante para o olho humano quando se obtém um resultado com escore alto (Chambers et al., 1993; Springer et al., 1993; Wilhelmus, 2001).

O “Draize Eye Test” é adotado pelo FDA, pela OECD, Ministério da Saúde e Bem-Estar do Japão e pelo governo do Canadá (Chambers et al., 1993; Springer et al., 1993; Wilhelmus, 2001; Organization for Economic Cooperation and Development, 1997; Consumer Product Safety Commission, 1990).

1.3 Angiogênese

Angiogênese é a formação de um novo vaso sanguíneo a partir de um já existente (Ferrara, 2002; Gupta, Zhang, 2005; van Wijngaarden et al., 2005; Erdurmus et al., 2007) e envolve uma série de mecanismos como proliferação e migração endotelial, degradação da matriz extracelular, remodelação da parede do vaso e sobrevivência da nova célula endotelial. Cada uma destas etapas é controlada por uma série de agentes angiogênicos (Barouch, Miller, 2006). O sucesso deste processo depende do delicado balanço entre os fatores que promovem o crescimento vascular (como o VEGF e o fator familiar de crescimento de fibroblastos) e os fatores inibitórios do crescimento vascular (como o trombospondin, angiostatin e endostatin) ao redor do endotélio (Gupta, Zhang, 2005; van Wijngaarden et al., 2005). Uma grande variedade de fatores de crescimento e citocinas podem induzir à angiogênese. Um dos mais específicos fatores regulatórios é o VEGF, que regula a

proliferação, a permeabilidade e a sobrevivência endotelial (Gupta, Zhang, 2005; van Wijngaarden et al., 2005).

Na NVC corneana, os neovasos se originam na microvasculatura do plexo pericorneal e o seu crescimento ocorre a partir de capilares e vênulas que se desenvolvem numa rede vascular para a córnea (Yaylali et al., 1998). O crescimento dos neovasos ocorre predominantemente nos primeiros sete dias após o trauma corneano; depois do que diminui (Jo et al., 2006). Estes novos vasos sanguíneos possuem pericitos, células endoteliais e células de músculo liso (Yaylali et al., 1998). Este processo depende do equilíbrio entre fatores de crescimento e fatores inibitórios do crescimento vascular presentes no endotélio (Gupta, Zhang, 2005). Em algumas situações patológicas, a córnea pode aumentar a produção de fatores de crescimento e diminuir a produção de fatores inibitórios (Zhang et al., 2005). Após um trauma corneano, numa primeira fase, ocorre proliferação do endotélio vascular, que depende do VEGF (Gan et al., 2004; Jo et al., 2006). Numa segunda fase, ocorre remodelação dos componentes da matriz extracelular, como a metaloproteíase e hialurônio, que promovem as mudanças necessárias para o crescimento dos vasos no interior da córnea (Kvanta et al., 2000; Gan, Fagerholm, 2001; Gan et al., 2004). Os polimorfonucleares estão implicados como fonte de VEGF (Kvanta et al., 2000; Gan et al., 2004). Outros fatores também estão envolvidos, como o bFGF (fator básico de crescimento do fibroblasto) (Gan et al., 2004; Jo et al., 2006), PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta) e angiopoetinas 1 e 2 (Jo et al., 2006; Dell et al., 2006).

A angiogênese possui ação importante em processos naturais normais, como na cicatrização de feridas, crescimento ósseo, desenvolvimento endometrial cíclico, vascularização placentária e formação de vasos colaterais na isquemia do miocárdio (Gupta, Zhang, 2005; van Wijngaarden et al., 2005).

A regulação anormal (aumento) da angiogênese está presente em várias doenças, como o câncer, artrite reumatóide, psoríase, retinopatia proliferativa e degeneração macular relacionada à idade (Ferrara, 2002; Gupta, Zhang, 2005). Em relação a estas alterações oculares, o VEGF tem sido identificado em membranas neovasculares e o nível intra-ocular do VEGF tem correlação com a severidade da neovascularização na retinopatia diabética (van Wijngaarden et al., 2005).

1.3.1 Fator de crescimento endotelial vascular

Fatores de crescimento são substâncias químicas presentes no soro ou produzidas por células que têm a função de estimular a proliferação celular. Alguns fatores de crescimento podem agir numa variedade de células, outros são mais específicos e possuem um alvo mais definido (Campos, 1999). Como exemplo deste tipo tem-se o VEGF.

O VEGF é um mediador importante na cascata da angiogênese e um potente fator de permeabilidade (van Wijngaarden et al., 2005). Sua característica principal é a especificidade para as células endoteliais. Devido a sua difusibilidade, ele parece ser o mais dinâmico regulador da angiogênese (Gupta, Zhang, 2005; van Wijngaarden et al., 2005).

O VEGF não é uma proteína única, mas uma pequena coleção de vários peptídeos de diferentes aminoácidos e talvez seja o fator regulador mais crítico no desenvolvimento do sistema vascular (Gupta, Zhang, 2005). O grupo dos polipeptídeos VEGF é composto pelos subgrupos VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento placentário. Um dos mais estudados até o momento é o VEGF-A (Rodrigues et al., 2006). O VEGF-A, localizado no cromossomo 6, é organizado em oito exons e pode ter seis espécies moleculares diferentes que contêm de 121 a 206 aminoácidos, denominados isoformas VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ (Ferrara, 2002; Rodrigues et al., 2006). O VEGF-A com 165 aminoácidos (VEGF₁₆₅) é o polipeptídeo predominante e o mais ativo (Ferrara, 2002). Também é o fator de crescimento vascular mais encontrado no olho (Rodrigues et al., 2006).

A proliferação celular é iniciada quando há uma ligação de um fator de crescimento com seu receptor específico presente na superfície celular ou dentro da célula. A ligação do fator de crescimento com o receptor induz a uma alteração conformacional no sítio extracelular levando a ativação de uma cascata de eventos (fosforilação protéica) que fará com que células em repouso entrem no ciclo celular de replicação (Campos, 1999).

Os receptores do VEGF são denominados VEGFR-1 e VEGFR-2. Estes receptores também são conhecidos como Flt1 e Flk1, respectivamente (Bayer Health Care, 2007). Ambos possuem um domínio extracelular, uma região transmembrana e um domínio intracelular que contém a sequência tirosina-quinase (Ferrara, 2002). Existe também o receptor 3 (VEGFR-3) que liga-se ao VEGF-C e D (e não ao VEGF-A) e está envolvido na regulação da angiogênese linfática (Ferrara, 2002). O VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos primariamente nas células endoteliais (Ferrara, 2002; Gupta, Zhang, 2005).

Como o VEGF é um regulador crucial da angiogênese, ele se tornou um alvo importante para tratamento de câncer e doenças oftálmicas (van Wijngaarden et al., 2005).

1.4 Bevacizumabe

Bevacizumabe (Avastin®) é um anticorpo monoclonal humanizado que tem como ação inibir a angiogênese agindo especificamente como inibidor do VEGF (Ferrara, 2002; Zondor, 2004; Rodrigues et al., 2006). Os anticorpos monoclonais são moléculas de imunoglobulinas produzidas em laboratório e que reconhecem porções antigênicas específicas. Anticorpos humanizados são moléculas cuja seqüência de aminoácidos é basicamente igual à dos seres humanos (Feher, 2006). A seqüência de aminoácidos do Avastin® é de aproximadamente 93% de imunoglobulina G (Ig G) humana e 7% de anticorpo murino e é fruto de engenharia genética utilizando células ovarianas de hamster chinês (Ferrara, 2002; Zondor, Medina, 2004). A humanização deste anticorpo mantém a sua alta especificidade e afinidade para o VEGF-A humano e diminui a sua imunogenicidade, bem como aumenta a sua vida-média (Ferrara, 2002), sendo bem tolerado clinicamente sem desencadear reações imunogênicas clinicamente significativas (Feher, 2006). Por outro lado o Avastin® pode apresentar efeitos adversos como hipertensão arterial, sangramento e aumento do risco de tromboembolismo (Zondor, Medina, 2004; Feher, 2006; Roche, 2007), até mesmo quando utilizado por via intra-ocular (Folkman, 2004). O bevacizumabe bloqueia as atividades biológicas do VEGF-A impedindo que suas isoformas se liguem aos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 (Rodrigues et al., 2006).

O Avastin®, em vários estudos clínicos controlados, prolongou a sobrevida de pacientes com câncer metastático de cólon (Folkman, 2004; Zondor, Medina, 2004; Gupta, Zhang, 2005).

No olho tem sido usado por via sistêmica e por injeção intra-ocular na degeneração macular relacionada à idade, oclusão venosa central e retinopatia diabética (Folkman, 2004; Ferrara, 2002; Feiner et al., 2006).

Manzano et al. (2007) utilizaram o Avastin® por via tópica (duas vezes ao dia por sete dias) em um experimento em olhos de ratos após queimadura corneana para observar o efeito da droga na neovascularização. Os resultados sugeriram que o avastin® inibe a neovascularização da córnea, apesar desta inibição não ter sido completa. Barros e

Belfort Junior (2007) utilizaram o Avastin® por via subconjuntival em um estudo com ratos e os resultados sugeriram que esta droga é capaz de inibir a angiogênese corneal.

Em um trabalho em olhos de coelhos, Yoeruek et al. (2007) utilizaram o bevacizumabe por via tópica. Este estudo mostrou efeito benéfico do Avastin® sobre a neovascularização e a opacidade corneana. Também, Hosseini et al. (2007) estudaram o efeito da injeção subconjuntival de 2,5 mg de bevacizumabe (em duas aplicações, totalizando 5 mg) na neovascularização de olhos de coelhos após queimadura com hidróxido de sódio. O efeito foi significativo na inibição da neovascularização.

Quanto à toxicidade ocular do bevacizumabe, só existem estudos em que se utiliza a droga por via intra-ocular. Feiner et al. (2006) não encontraram evidências de toxicidade retiniana após injeção intravítrea de bevacizumabe em coelhos, entretanto enfatizam que estudos clínicos bem elaborados são necessários para determinar o melhor agente anti-VEGF, bem como para otimizar a dose e a frequência de administração. Em um outro estudo para avaliar a toxicidade retiniana do Avastin®, a injeção intra-vítrea desta droga não mostrou ser tóxica para a retina (Manzano et al., 2006). Por outro lado, Afzal et al. (2007) afirmam que é importante considerar os efeitos colaterais oculares e sistêmicos das terapias antiangiogênicas. Ressaltam, ainda, que o VEGF é um fator de sobrevivência para todas as células endoteliais e a perda do VEGF pode resultar em uma inabilidade da vasculatura normal de proliferar em resposta a um trauma e de manter a morfologia endotelial normal, incluindo a fenestração na coriocapilar ocular e até mesmo no glomérulo renal.

2 OBJETIVOS

Avaliar a toxicidade do uso tópico e da injeção subconjuntival do bevacizumabe (Avastin®) na superfície ocular íntegra (conjuntiva e córnea) de olhos de coelhos, por intermédio de avaliação clínica e histopatológica.

Avaliar e comparar o efeito do uso tópico e da injeção subconjuntival do bevacizumabe (Avastin®) na neovascularização corneana de olhos de coelhos após queimadura química.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Período e Local do Estudo

Este estudo foi realizado no Biotério da Pós-graduação do CCS da UEL no ano de 2006 e 2007. A análise clínica foi realizada no mesmo laboratório e incluiu exame macroscópico e microscópico (utilizando-se microscópio cirúrgico). O preparo da peça e da lâmina foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Londrina. Fotos ilustrativas do biotério são apresentadas nas figuras 1 e 2 (Apêndice H).

3.2 Delineamento do Estudo

Estudo experimental em olhos de coelhos.

3.3 Amostra

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL, foram utilizados 60 coelhos machos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia branco, com peso em torno de 2,5kg, procedentes do Departamento de Zootecnia da UEM.

3.4 Ambiente de Experimentação

Os animais ficaram no coelhário do Biotério da Pós-graduação do CCS da UEL, sob supervisão do médico veterinário responsável pelo biotério e laboratório de técnica cirúrgica, metabologia e cirurgia experimental do CCS. Os coelhos permaneceram em gaiolas individuais de arame galvanizado de 40x40x60 cm, suspensas, com controle de luz e de temperatura; os animais foram alimentados com água e ração *ad libitum*. O coelhário tem proteção contra a entrada de roedores e outros animais. Os coelhos ficaram sete dias em observação antes de cada etapa do experimento.

3.5 Avastin®

O Avastin® é definido como antineoplásico. É fabricado pela Genentech Inc. (South San Francisco, CA, EUA), embalado por F. Hoffmann-La Roche Ltd (Kaiseraugst, Suíça) e importado e distribuído no Brasil por Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. (Rio de Janeiro, RJ) (Roche, 2007).

O seu ingrediente ativo é o bevacizumabe. Na apresentação de 100mg possui os excipientes α , α -trealose diidratada (240mg); fosfato de sódio, monobásico, monoidratado (23,2mg); fosfato de sódio, dibásico, anidro (4,8mg); polisorbato 20 (1,6mg) e água para injetável, USP. O seu pH é ligeiramente ácido (6,2), não contém conservante antimicrobiano, é sensível à luz e deve ser conservado à temperatura de 2° a 8° Celsius (Roche, 2007; Genentech, 2008). Segundo Feiner et al. (2006), nenhum destes elementos resultariam em toxicidade para o olho.

Neste estudo foi utilizada a apresentação comercial injetável para infusão intravenosa de 100mg (frasco-ampola de 4 ml contendo 25mg/ml de bevacizumabe). Para a instilação do Avastin®, foi aspirado em uma seringa o conteúdo de uma ampola e injetado num frasco adequado, limpo e estéril, tomando-se todos os cuidados de assepsia. Para a injeção subconjuntival, procedeu-se da mesma forma e, imediatamente após este procedimento, a preparação foi utilizada nos animais. Todas as recomendações do fabricante foram seguidas.

3.6 Definição dos Grupos

Etapa 1 – constituído por 20 animais distribuídos de forma aleatória em quatro grupos de cinco animais cada: A1, B1, C1 e D1.

Etapa 2 – constituído por 20 animais distribuídos de forma aleatória em quatro grupos de cinco animais cada: A2, B2, C2 e D2.

Etapa 3 – constituído por 20 animais distribuídos de forma aleatória em quatro grupos de cinco animais cada: A3, B3, C3 e D3.

Nas etapas 1 e 2, ambos os olhos do primeiro animal de cada grupo (correspondente aos coelhos 1, 6, 11 e 16) se constituíram em controle. O segundo e terceiro animal de cada grupo (correspondente aos coelhos 2 e 3, 7 e 8, 12 e 13, 17 e 18) tiveram seus olhos esquerdos como controle. O quarto e quinto animal de cada grupo (correspondente aos

coelhos 4 e 5, 9 e 10, 14 e 15, 19 e 20) tiveram ambos os olhos como experimento. Foi realizado desta forma pela possibilidade da absorção sistêmica ter efeito no olho contralateral.

Na etapa 3, os primeiros cinco animais constituíram-se em grupo-controle (subgrupo A3), assim como os cinco animais do subgrupo C3. Os subgrupos B3 e D3 constituíram-se grupo-experimental.

3.7 Etapas Experimentais

O experimento foi realizado em três etapas. A primeira etapa visou avaliar a toxicidade da instilação do Avastin® para a superfície ocular sadia, comparando-se essa toxicidade com a ação do SF, instilado nos olhos do grupo-controle. Na segunda etapa do experimento, a toxicidade do Avastin® foi avaliada pela injeção subconjuntival da droga comparando-se esta com a injeção subconjuntival de SF nos olhos hígidos de coelho.

A terceira etapa observou o efeito do bevacizumabe na neovascularização corneana após queimadura. Em um grupo de coelhos foi instilado a droga, enquanto em outro foi aplicada injeção subconjuntival, sendo os dois procedimentos comparados com a instilação e injeção subconjuntival de SF e entre si.

Os animais foram tratados de acordo com as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e Canadian Council Animal Care e a eutanásia realizada conforme resolução nº714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, capítulo III, art. 12, anexo I: anestesia geral com Ketamina e Xilasina seguido de injeção intra-cardíaca de Cloreto de Potássio a 20% (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991; De Luca, 1996).

3.7.1 Etapa 1

Instilação de uma gota (aproximadamente 0,04ml da apresentação comercial do bevacizumabe na concentração de 25mg/ml) da droga em estudo ou de uma gota de SF, no fundo de saco conjuntival, 02 vezes ao dia por três dias.

Não houve necessidade de sedação dos animais; eles foram apenas imobilizados para a instilação dos medicamentos e para o exame.

No quadro 1 apresenta-se o esquema de administração utilizado.

Quadro 1 – Esquema de instilação e injeção do SF e do AV.

COELHOS	OLHO DIREITO	OLHO ESQUERDO
Grupo A1/A2 - 1 A 5		
1	SF	SF
2	AV	SF
3	AV	SF
4	AV	AV
5	AV	AV
Grupo B1/B2 - 6 A 10		
6	SF	SF
7	AV	SF
8	AV	SF
9	AV	AV
10	AV	AV
Grupo C1/C2 - 11 A 15		
11	SF	SF
12	AV	SF
13	AV	SF
14	AV	AV
15	AV	AV
Grupo D1/D2 - 16 A 20		
16	SF	SF
17	AV	SF
18	AV	SF
19	AV	AV
20	AV	AV

Avaliou-se o efeito das drogas e posteriormente sacrificaram-se os animais obedecendo-se à seguinte ordem:

Grupo A1 – uma hora após o início da instilação;

Grupo B1 - 24hs/1º. dia após início da instilação;

Grupo C1 - 48horas/2º. dia após início da instilação;

Grupo D1 - 72 horas/3º. dia após início da instilação;

Imediatamente após a eutanásia foi instilado formol a 10% nos olhos e foi realizada a retirada de uma porção de conjuntiva bulbar do lado temporal superior (de 4mm de comprimento por 3mm de largura e a uma distância de aproximadamente 1mm do limbo) e a córnea de cada olho. A córnea foi marcada com um ponto de tinta nanquim às 9 horas e às 3 horas, antes da retirada, para servir de referência para a confecção da peça e corte histológico. Cada peça foi colocada separadamente em formol a 10% para posterior preparo da lâmina para estudo histopatológico (Alves et al., 1996; Holzchuh et al., 2004). (A conjuntiva foi colocada aberta em pedaço de papel filtro para melhor preparo do bloco de parafina e lâmina).

3.7.2 Etapa 2

Os coelhos do grupo 2 foram submetidos à injeção subconjuntival de 0,1 ml da droga em estudo ou de SF para controle, no lado temporal superior da conjuntiva bulbar. A dose da droga foi de 2,5 mg (0,1 ml da apresentação comercial do bevacizumabe na concentração de 25mg/ml) em injeção única.

Para a injeção subconjuntival dos medicamentos, foi instilado colírio anestésico de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®) previamente à injeção.

No quadro 1 apresenta-se o esquema de administração utilizado.

Realizou-se a avaliação do efeito das drogas e posteriormente sacrificaram-se os animais obedecendo-se à seguinte ordem:

grupo A2 – uma hora após o início da injeção;

grupo B2 - 24hs/1º. dia após início da injeção;

grupo C2 - 48horas/2º. dia após início da injeção;

grupo D2 - 72 horas/3º. dia após início da injeção;

Imediatamente após a eutanásia procedeu-se da mesma forma que na etapa 1.

3.7.3 Etapa 3

Inicialmente procedeu-se à queimadura corneana, realizada sob microscopia (microscópio cirúrgico), com papel de filtro tipo 50 cortado em forma circular com três milímetros de diâmetro, embebido em hidróxido de sódio 1mol/litro. O papel foi aplicado excentricamente na córnea a aproximadamente 1mm do limbo, no setor superior dos olhos dos coelhos por 60 segundos, sempre no olho direito. Imediatamente após a queimadura o olho foi irrigado com 20ml de SF (Deutsch, Hughes, 1979; Connors et al., 1997; Schwartz et al., 1998; Gan et al., 2004; Zhang et al., 2005).

Imediatamente após a queimadura, em um grupo foi aplicado injeção subconjuntival da droga e em outro grupo foi instilado o Avastin®. Ambos os grupos foram confrontados com o uso de SF na mesma forma de administração (Deutsch, Hughes, 1979; Connors et al., 1997; Schwartz et al., 1998; Hepsen et al., 1999; Riazi-Esfahani et al., 2006; Manzano et al., 2007).

A injeção subconjuntival da droga em estudo e do soro fisiológico 0,9% foi de 0,1 ml. A dose de Avastin® foi de 2,5 mg, ou seja, 0,1ml da apresentação comercial do

bevacizumabe na concentração de 25mg/ml, em injeção única (Manzano et al., 2007; Shahar et al., 2006). A injeção subconjuntival foi aplicada na porção superior da conjuntiva bulbar, próxima do local de queimadura. A instilação da droga em estudo e do SF foi de uma gota no fundo de saco conjuntival duas vezes ao dia por dez dias (Manzano et al., 2007).

Para a realização da queimadura e injeção dos medicamentos os animais foram submetidos à anestesia geral com ketamina e xilasina (ketamina 40mg/kg e xilasina 3mg/kg intramuscular) acrescida da instilação de colírio anestésico de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®) (Conners et al., 1997; Riazi-Esfahani et al., 2006; Manzano et al., 2007). A analgesia foi obtida com tramadol na dose de 2 a 4 mg/kg, duas vezes ao dia, via oral, nas primeiras vinte e quatro horas (MediRabbit, 2007). Nos dias subsequentes a analgesia seria realizada caso os animais apresentassem sinais clínicos de dor, o que não ocorreu. Para o exame nos dias consecutivos e para fotografia, os coelhos foram apenas imobilizados.

A avaliação da conjuntiva, córnea e íris, o registro dos dados e o registro fotográfico foram realizados no quinto e décimo dia após o início dos experimentos. No décimo dia os animais foram sacrificados.

Fotos ilustrativas desta etapa são apresentadas nas figuras 3, 4 e 5 (Apêndice H).

No quadro 2 apresenta-se o esquema de administração utilizado.

Quadro 2 - Esquema de injeção e instilação da droga AV e do SF após a queimadura corneana.

COELHOS	OLHO DIREITO
Grupo A3	
1	Injeção SF
2	Injeção SF
3	Injeção SF
4	Injeção SF
5	Injeção SF
Grupo B3	
6	Injeção AV
7	Injeção AV
8	Injeção AV
9	Injeção AV
10	Injeção AV
Grupo C3	
11	Instilação SF
12	Instilação SF
13	Instilação SF
14	Instilação SF
15	Instilação SF
Grupo D3	
16	Instilação AV
17	Instilação AV
18	Instilação AV
19	Instilação AV
20	Instilação AV

3.8 Métodos de Aferição

3.8.1 Exame da conjuntiva, córnea e íris

Realizado por examinador único e “cego” (docente do departamento de clínica cirúrgica, setor de oftalmologia, da UEL). Consistiu em exame sob microscopia utilizando-se microscópio cirúrgico da marca DFVasconcelos modelo MC – M58, com fibra ótica.

3.8.1.1 Avaliação com microscópio cirúrgico

Classificou-se o estado destas estruturas conforme escala de graduação a seguir (Quadro 3) (Chambers et al., 1993; Springer et al., 1993; Wilhelmus, 2001).

Quadro 3 - Escala de graduação dos efeitos das substâncias nas estruturas oculares.

Córnea	Escore
Sem ulceração ou opacidade	0
Áreas difusas de opacidade; detalhes da íris claramente visíveis	1
Áreas translúcidas facilmente distinguíveis; detalhes da íris levemente obscuros	2
Áreas de opalescência; detalhes da íris não visíveis; tamanho da pupila pobremente distinguível	3
Opacidade corneana total; íris não distinguível	4
Íris	
Normal	0
Dobras profundas na íris, congestão, edema e injeção ciliar (qualquer um ou combinação de alguns destes); íris continua reagindo à luz (reação lenta)	1
Sem reação à luz, hemorragia e destruição (qualquer um ou todos)	2
Vermelhidão da conjuntiva (conjuntiva palpebral e bulbar)	
Vasos sanguíneos normais	0
Hiperemia setorial	1
Mais difusa, coloração rubra; vasos individuais não facilmente visível	2
Difusa, vermelho “carne”	3
Resultado total = soma de todos resultados obtidos para a córnea, íris e conjuntiva	

3.8.1.2 Estado epitelial da córnea

Para a observação do estado epitelial do grupo 1 e 2 foi instilada fluoresceína sódica a 1% colírio, uma gota em ambos os olhos. A classificação foi de zero a quatro cruzes (Wilhelmus, 2001).

3.8.1.3 Análise histopatológica

No grupo 1 e 2, após a inclusão do material em parafina, foram realizados cortes histológicos de 5 μ e corados com hematoxilina-eosina. A córnea foi cortada ao meio nos pontos previamente marcados e uma das metades foi incluída em parafina; os cortes foram realizados na face central deste segmento corneano.

Foi observado o tipo de infiltrado inflamatório presente, tendo-se como parâmetro o grupo-controle. A reação inflamatória foi avaliada pela celularidade. A quantificação da celularidade foi realizada por morfometria, método para mensuração microscópica que melhora a reprodutibilidade e a acurácia da análise histopatológica (Collan, 1984; Lacerda, 1995; Holzchuh et al., 2004). As imagens das lâminas foram capturadas por câmara digital 3CCD Pro Series da Media Cybernetics. Foram capturados dez campos de cada lâmina com a objetiva de 10X, aumento de 100X. O programa utilizado foi o Image Pro plus 4.5, acoplado ao microscópio Olympus Bx 50. O analisador de imagens foi calibrado utilizando-se uma lâmina micrometrada da Olympus. As imagens foram armazenadas em CD_ROM no formato JPEG (*.jpg), para posterior análise e documentação. Os equipamentos pertencem ao Departamento de Ciências Morfofisiológicas da UEM e as análises foram realizadas pelo técnico responsável.

3.8.1.4 Neovascularização corneana

No grupo 3, a avaliação, registro dos dados, bem como o registro fotográfico, ocorreram no quinto e décimo dia após o início do experimento (Mahoney, Waterbury, 1985; Connors et al., 1997; Erdurmus et al., 2007; Manzano et al., 2007). A neovascularização foi avaliada com microscópio cirúrgico e classificada conforme escala abaixo (Mahoney, Waterbury, 1985; Deutsch, Hughes, 1979). (Quadro 4).

Quadro 4 – Escala de graduação da neovascularização corneana.

Córnea	Escore de neovascularização
Sem vasos na córnea	0
Vasos <1mm na córnea	1+
Vasos de 1 a 1,9mm na córnea	2+
Vasos de 2 a 2,9mm na córnea	3+
Vasos \geq 3mm na córnea	4+

Fonte: Adaptado de: Deutsch e Hughes (1979)

Foi realizado, pelo examinador, um desenho diário dos vasos sanguíneos na córnea mostrando o crescimento dos neovasos. Estes desenhos serviram para comparação com as fotos digitais tiradas no quinto e décimo dia e para aumento da segurança no cálculo da área de NVC corneana. Fotos ilustrativas são apresentadas na figura 13 (Apêndice H).

O registro fotográfico foi realizado com câmara fotográfica digital Canon® modelo Rebel XT com lente macro de 100 mm e flash em anel modelo MR14. Várias fotos foram tiradas de cada olho. A melhor delas foi selecionada para análise computadorizada da área corneana neovascularizada.

No décimo dia os animais foram sacrificados e foi instilado formol a 10% (Alves et al., 1996; Holzchuh et al., 2004) nos olhos com queimadura e foi feita a retirada, sob microscopia, do segmento corneano com neovasos com uma margem de 1mm além dos vasos sanguíneos. Esta peça foi colocada em formol a 10% para posterior processamento e preparo da lâmina para estudo histopatológico (Mahoney, Waterbury, 1985; Erdurmus et al., 2007; Alves et al., 1996; Manzano et al., 2007). Fotos ilustrativas são apresentadas na figura 6 (Apêndice H).

Para a análise da imagem corneana utilizou-se o programa de computador de domínio público denominado ImageJ 1.38x, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Java 1.6.0_02 (Riazi-Esfahani et al., 2006; Manzano et al., 2007). Esta análise foi realizada por um técnico em programas de imagem, porém desconhecedor do esquema de aplicação da droga e do SF. O cálculo da área neovascularizada de cada córnea foi feito em número de *pixels* e transformada em porcentagem da área total da córnea. Três medidas foram realizadas e a média obtida foi o resultado final (Riazi-Esfahani et al., 2006; Manzano et al., 2007). Fotos ilustrativas são apresentadas nas figuras 14 e 15 (Apêndice H).

3.9 Estudo Piloto

Previamente à realização das etapas 01 e 02, foi realizado um estudo-piloto em quatro coelhos (oito olhos) para verificar as condições técnicas da instilação e da injeção subconjuntival da droga e do SF, o modo de imobilização do coelho e a reação do animal à instilação, à injeção e ao exame, bem como a técnica de eutanásia, de retirada da conjuntiva e córnea e do estudo histopatológico.

Para a etapa 03, o estudo-piloto foi realizado em quatro coelhos (quatro olhos) para verificar as condições técnicas da queimadura corneana (em um só olho), exame macroscópico e no microscópio cirúrgico, fotografia da córnea e análise histopatológica. Estes animais não foram analisados no estudo

3.10 Análise dos Dados

Aplicou-se o teste de Mann-Whitney para comparar o exame externo (segundo a escala de graduação) e a contagem das células inflamatórias dos olhos sob o efeito do Avastin® e SF em todos os tempos das etapas 1 e 2.

Quanto à etapa 3, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn com $p < 0,05$ para comparação dos grupos dois a dois na análise do exame externo da neovascularização corneana. Na análise da área de neovascularização corneana, aplicou-se o teste F de análise de variância.

A significância estatística foi definida como valor de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Uso Tópico do Avastin® (Etapa 1)

4.1.1 Exame da conjuntiva, córnea e íris

No exame realizado antes do início do experimento, 6(15%) olhos apresentaram escore 0 (vasos sangüíneos normais) e 34(85%) apresentaram escore 1 (alguns vasos hiperêmicos).

Em todas as fases, da pré-instilação ao terceiro dia, o exame externo (escore segundo o quadro 3) mostrou que não houve alteração na córnea (mesmo com a fluoresceína) e íris em todos os olhos; portanto, o escore destas estruturas foi zero (0). As alterações na conjuntiva foram discretas. Mais especificações no apêndice A (tabela A₁). Fotos ilustrativas são apresentadas nas figuras 1 e 2 (apêndice F).

4.1.2 Contagem de células inflamatórias na conjuntiva e córnea

As células encontradas foram neutrófilos, eosinófilos e linfócitos.

Os resultados da contagem do total de células inflamatórias na conjuntiva e na córnea na primeira hora, no primeiro, segundo e terceiro dia, respectivamente, são apresentados no apêndice A (tabelas A₂ a A₅). Fotos ilustrativas do exame histopatológico são apresentadas nas figuras 1 e 2 (Apêndice G).

4.1.3 Análise dos dados

Como a avaliação do exame externo mostrou claramente que não houve toxicidade da droga em estudo para a superfície ocular dos olhos dos coelhos, optou-se por realizar a análise estatística considerando-se o número total de olhos.

O escore mediano do exame externo e da contagem de células inflamatórias realizados após os tempos predeterminados de instilação do SF e do Avastin® não apresentou diferença significativa (tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Resultado da avaliação do exame externo dos olhos dos coelhos, pela escala de graduação dos efeitos oculares, de acordo com o tempo transcorrido após a instilação do SF e do Avastin®.

	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	25%	Mediana	75%	Máximo	Valor de p*
1ª Hora									
AV	24	1,04	0,20	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	0,154
SF	16	0,94	0,25	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
1º Dia									
AV	18	1,00	0,34	0,0	1,0	1,0	1,0	2,0	1,000
SF	12	1,00	0,43	0,0	1,0	1,0	1,0	2,0	
2º Dia									
AV	12	0,67	0,49	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	0,698
SF	8	0,75	0,46	0,0	0,5	1,0	1,0	1,0	
3º Dia									
AV	6	0,67	0,52	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	0,789
SF	4	0,75	0,50	0,0	0,5	1,0	1,0	1,0	

* Valor de p do teste de Mann-Whitney.

Tabela 2 – Resultado da contagem de células inflamatórias realizada na conjuntiva e na córnea dos olhos dos coelhos, de acordo com o tempo transcorrido após a instilação do SF e do Avastin®.

	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	25%	Mediana	75%	Máximo	Valor de p*
Número de células inflamatórias na conjuntiva									
1ª Hora									
AV	6	93,25	53,03	17,0	62,0	108,0	124,5	140,0	0,248
SF	4	52,75	17,23	28,0	42,5	57,5	63,0	68,0	
1º Dia									
AV	6	87,50	76,74	15,0	31,0	74,0	112,0	219,0	0,286
SF	4	39,25	34,16	2,0	10,5	41,0	68,0	73,0	
2º Dia									
AV	4	51,25	13,84	44,0	44,0	44,5	58,5	72,0	0,245
SF	4	37,25	31,26	2,0	17,0	34,5	57,5	78,0	
3º Dia									
AV	6	35,67	24,03	17,0	18,0	28,0	44,0	79,0	0,522
SF	4	20,25	9,74	6,0	14,5	23,5	26,0	28,0	
Número de células inflamatórias na córnea									
1ª Hora									
AV	6	19,00	21,16	0,0	5,0	13,5	23,0	59,0	0,915
SF	4	17,50	16,44	8,0	8,0	10,0	27,0	42,0	
1º Dia									
AV	6	10,67	13,19	3,0	3,0	5,5	10,0	37,0	0,108
SF	4	45,50	54,34	7,0	14,5	24,5	76,5	126,0	
2º Dia									
AV	6	14,00	6,26	7,0	9,0	12,5	20,0	23,0	1,000
SF	4	17,00	17,68	0,0	2,5	15,0	31,5	38,0	
3º Dia									
AV	6	27,67	31,60	2,0	3,0	21,0	32,0	87,0	0,670
SF	4	12,75	6,18	4,0	8,5	14,5	17,0	18,0	

* Valor de p do teste de Mann-Whitney.

4.2 Injeção Subconjuntival do Avastin® (Etapa 2)

4.2.1 Exame da conjuntiva, córnea e íris

No exame realizado antes do início do experimento, 2(5%) olhos apresentaram escore 0 (vasos sangüíneos normais) e 38(95%) apresentaram escore 1 (alguns vasos hiperêmicos).

Em todas as fases, da pré-injeção ao terceiro dia, o exame externo (escore segundo quadro 3) mostrou que não houve alteração na córnea (mesmo com a fluoresceína) e íris em todos os olhos; portanto os escores destas estruturas foram zero (0). As alterações na conjuntiva foram discretas e são apresentadas no apêndice A (tabela A₆).

4.2.2 Contagem de células inflamatórias na conjuntiva e córnea

As células encontradas foram neutrófilos, eosinófilos e linfócitos.

Os resultados da contagem do total de células inflamatórias na conjuntiva e na córnea na primeira hora, no primeiro, segundo e terceiro dia, respectivamente, são apresentados no apêndice A (tabela A₇ a A₁₀). Fotos ilustrativas do exame histopatológico são apresentadas nas figuras 3 e 4 (Apêndice G).

4.2.3 Análise dos dados

Como a avaliação do exame externo mostrou claramente que não houve toxicidade da droga em estudo para a superfície ocular dos olhos dos coelhos, optou-se por realizar a análise estatística considerando-se o número total de olhos.

O escore mediano do exame externo e da contagem de células inflamatórias realizados após os tempos pré-determinados de injeção do SF e do Avastin® não apresentou diferença significativa, com exceção do número de células inflamatórias na conjuntiva no 1º dia (tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Resultado da avaliação do exame externo dos olhos dos coelhos, pela escala de graduação dos efeitos oculares, de acordo com o tempo transcorrido após injeção do SF e do Avastin®.

	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	25%	Mediana	75%	Máximo	Valor de p*
1ª Hora									
AV	24	1,00	0,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,221
SF	16	1,06	0,25	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	
1º Dia									
AV	18	0,94	0,24	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,655
SF	12	1,00	0,43	0,0	1,0	1,0	1,0	2,0	
2º Dia									
AV	12	0,83	0,39	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,236
SF	8	1,00	0,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
3º Dia									
AV	6	0,67	0,52	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	0,221
SF	4	1,00	0,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	

* Valor de p do teste de Mann-Whitney.

Tabela 4 – Resultado da contagem de células inflamatórias na conjuntiva e na córnea dos olhos dos coelhos, de acordo com o tempo após a injeção do SF e do Avastin®.

	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	25%	Mediana	75%	Máximo	Valor de p*
Número de células inflamatórias na conjuntiva									
1ª Hora									
AV	6	61,50	32,61	8,0	51,0	59,5	92,0	99,0	0,286
SF	4	45,50	21,02	34,0	34,5	35,5	56,5	77,0	
1º Dia									
AV	6	63,50	11,17	44,0	61,0	64,0	72,0	76,0	0,033
SF	4	42,25	9,91	33,0	34,5	40,5	50,0	55,0	
2º Dia									
AV	6	43,67	17,34	21,0	36,0	38,5	59,0	69,0	0,286
SF	4	67,25	35,39	29,0	40,0	64,5	94,5	111,0	
3º Dia									
AV	6	47,00	16,59	28,0	34,0	45,5	56,0	73,0	0,394
SF	4	38,75	29,96	12,0	18,5	31,0	59,0	81,0	
Número de células inflamatórias na córnea									
1ª Hora									
AV	6	8,17	12,21	0,0	0,0	4,0	9,0	32,0	0,660
SF	4	5,75	9,60	0,0	0,0	1,5	11,5	20,0	
1º Dia									
AV	6	0,00	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
SF	4	0,00	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
2º Dia									
AV	6	0,00	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,066
SF	4	0,50	0,58	0,0	0,0	0,5	1,0	1,0	
3º Dia									
AV	6	0,00	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
SF	4	0,00	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

* Valor de p do teste de Mann-Whitney.

4.3 Efeito do Uso Tópico e Subconjuntival do Avastin® na Neovascularização Corneana (Etapa 3)

No dia zero, ou seja, antes do início desta etapa do experimento, todos os coelhos apresentaram conjuntiva com alguns vasos hiperêmicos (escore 1 no quadro 3), córnea clara, brilhante e sem vasos e íris normal (escore 0 no quadro 3 e 4). Fotos ilustrativas são apresentadas na figura 7 (Apêndice H).

No primeiro dia após a queimadura todos os olhos apresentaram conjuntiva com vermelhidão difusa e vasos não facilmente visíveis na porção superior (escore 2 no quadro 3), opacidade corneana total no local queimado (escore 4 no quadro 3); ou seja, a queimadura se apresentava uniforme em todos os olhos; havia ausência de vasos na córnea (escore 0 no quadro 4); íris com congestão e reagindo lentamente à luz (escore 1 no quadro 3) e córnea corando com fluoresceína quatro cruzeiros (escore 4 no quadro 3).

Na tabela 5 são apresentados os resultados do exame externo (no quinto e décimo dia) e da área corneana neovascularizada, em porcentagem (análise computadorizada das fotografias da córnea). Fotos ilustrativas dos neovasos e da área de NVC são apresentadas nas figuras 8 a 15 (Apêndice H).

Dois coelhos morreram (coelhos 7 e 18) no primeiro dia do experimento e não foram computados nos cálculos. Embora não tenha sido realizada necrópsia destes animais, clinicamente a morte foi por quadro respiratório agudo de pneumonia, segundo foi atestado pelo veterinário responsável.

O exame histopatológico mostrou menor NVC da córnea no grupo experimental do que no grupo-controle, coincidindo com os achados de cálculo da área de NVC. O tipo celular encontrado foram neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Na análise histopatológica da estrutura da parede dos neovasos, não houve diferença entre o grupo-controle e o experimental.

Tabela 5 - Resultado da avaliação do exame externo e da área de neovascularização dos olhos dos coelhos no 5º dia e 10º. dia de observação.

	Exame externo		Área de neovasos	
	5º. dia	10º. dia	5º. dia	10º. dia
A3 - injeção SF				
Coelho 1	2+	4+	4,3%	12,7%
Coelho 2	2+	4+	5,0%	9,1%
Coelho 3	2+	4+	7,9%	12,3%
Coelho 4	2+	4+	4,9%	6,6%
Coelho 5	2+	4+	5,1%	8,6%
B3 - injeção AV				
Coelho 6	1+	2+	2,2%	1,8%
Coelho 7	-	-	-	-
Coelho 8	1+	2+	1,3%	2,9%
Coelho 9	2+	3+	5,4%	7,4%
Coelho 10	1+	2+	1,4%	3,2%
C3 - instilação SF				
Coelho 11	3+	4+	3,1%	8,8%
Coelho 12	3+	4+	5,7%	8,4%
Coelho 13	3+	4+	6,7%	10,0%
Coelho 14	3+	4+	6,3%	8,7%
Coelho 15	3+	4+	5,4%	8,2%
D3 - instilação AV				
Coelho 16	1+	2+	1,9%	1,4%
Coelho 17	1+	2+	1,2%	1,5%
Coelho 18	-	-	-	-
Coelho 19	3+	3+	5,6%	5,0%
Coelho 20	0	0	0,0%	0,0%

SF = Soro fisiológico

AV = Avastin®

(-) = morreu

4.3.1 Análise dos dados

Nas comparações dos grupos dois a dois não foram detectadas diferenças significativas, porém ao analisarem-se os fatores envolvidos (procedimentos: injeção ou instilação, e as drogas: Avastatin ou SF) verificou-se que a injeção não diferiu da instilação, mas o grupo do Avastin® diferiu do grupo do SF (tabela 6).

Tabela 6 – Resultado da avaliação do exame externo e da área de neovascularização dos olhos dos coelhos no 5º dia e 10º. dia de observação.

	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	25%	Mediana	75%	Máximo	Valor de p
Exame 5º dia									
Injeção de AV	4	1,25	0,50	1,0	1,0	1,0	1,5	2,0	0,0099*
Injeção de SF	5	2,00	0,00	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	
Instilação de AV	4	1,25	1,26	0,0	0,5	1,0	2,0	3,0	
Instilação de SF	5	3,00	0,00	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	
Exame 10º dia									
Injeção de AV	4	2,25	0,50	2,0	2,0	2,0	2,5	3,0	0,0013*
Injeção de SF	5	4,00	0,00	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	
Instilação de AV	4	1,75	1,26	0,0	1,0	2,0	2,5	3,0	
Instilação de SF	5	4,00	0,00	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	
Área 5º dia									
Injeção de AV	4	2,58	1,93	1,3	1,4	1,8	3,8	5,4	0,0220†
Injeção de SF	5	5,44	1,41	4,3	4,9	5,0	5,1	7,9	
Instilação de AV	4	2,18	2,41	0,0	0,6	1,6	3,8	5,6	
Instilação de SF	5	5,44	1,40	3,1	5,4	5,7	6,3	6,7	
Área 10º dia									
Injeção de AV	4	3,83	2,46	1,8	2,4	3,1	5,3	7,4	0,0001†
Injeção de SF	5	9,86	2,59	6,6	8,6	9,1	12,3	12,7	
Instilação de AV	4	1,98	2,13	0,0	0,7	1,5	3,3	5,0	
Instilação de SF	5	8,82	0,70	8,2	8,4	8,7	8,8	10,0	

* Valor de p do teste de Kruskal-Wallis;

† Valor de p do teste F da análise de variância

5 DISCUSSÃO

Para que uma substância possa ser usada na superfície do olho, ela deve passar por um teste de irritação ocular com o propósito de verificar sua toxicidade. Gupta e Schiavo (1976) afirmam que testes em animais devem preceder os ensaios clínicos em humanos.

Vale ressaltar que, mesmo antes do experimento, no exame externo a maioria dos olhos apresentava escore 1 (85% dos olhos antes da instilação e 95% antes da injeção). Na primeira hora e nos dias subsequentes após a instilação e a injeção das substâncias, todos os olhos apresentaram a córnea e a íris sem alteração; apenas a conjuntiva mostrou alteração e, mesmo assim, com escore baixo. A maioria dos olhos apresentou alguns vasos hiperêmicos (escore 1 no quadro 3) e pouquíssimos olhos apresentaram vermelhidão conjuntival mais difusa com vasos individuais não facilmente visíveis (escore 2 no quadro 3); a partir do segundo dia nenhum olho apresentou escore 2. O exame com fluoresceína para verificar o estado epitelial corneano mostrou que todos os olhos tiveram escore zero (ausência de áreas corando), ou seja, não houve dano epitelial. Isso ressalta que não houve agressão à superfície ocular com a administração das substâncias.

Os danos oculares causados por substâncias agressivas se traduzem por uma inflamação aguda que se inicia rapidamente e, geralmente, tem duração curta, de horas a poucos dias. Levando-se em consideração que o “The Draize Eye Test” é positivo quando se obtém opacidade corneana com escore ≥ 1 , irite ≥ 1 e vermelhidão conjuntival ≥ 2 (Chambers et al., 1993; Wilhelmus, 2001), fica evidente que o Avastin® não causou agressão à conjuntiva e córnea, no presente estudo.

A análise dos dados mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre o uso do SF e o Avastin®, tanto na avaliação do exame externo quanto na contagem de células inflamatórias na conjuntiva e córnea, na etapa 1, instilação da droga.

Na etapa 2, o mesmo quadro se repete quanto ao exame externo. Após a contagem das células inflamatórias na conjuntiva, apurou-se que a diferença entre o SF e o Avastin®, ambos injetados, foi significativa, apenas no primeiro dia. O resultado sugere que a injeção do Avastin® causou uma inflamação conjuntival aguda que desapareceu a partir do segundo dia.

Entre os estudos que avaliaram a toxicidade corneana mediante o uso de outras drogas, podem-se citar os de Sun et al. (1999) que pesquisaram o efeito de quatro

agentes anestésicos, comercialmente disponíveis, em olhos de coelhos. Estes autores salientaram que duas destas drogas já eram usadas em cirurgias de catarata em humanos. Os autores não encontraram toxicidade corneana após o uso desses anestésicos.

Alves e Bignardi (1997) desenvolveram um estudo dos efeitos do uso tópico da mitomicina C na superfície conjuntival de coelhas. Eles enfatizaram que a instilação tópica da mitomicina C já havia sido utilizada em humanos como terapêutica adjuvante na cirurgia de pterígio com o objetivo de prevenir a recidiva, mas que a ocorrência de complicações graves nestes casos levou à necessidade de estudos experimentais para avaliação da segurança do uso desta droga. Estes autores observaram hiperemia conjuntival discreta nos olhos com superfície ocular íntegra medicados com mitomicina C.

Schwartz et al. (1998) experimentaram o *tetrodotoxin* (um anestésico tópico de longa duração) em olhos de coelhos e não encontraram irritação ocular, afinamento corneano ou toxicidade sistêmica.

Segundo Hogan et al. (1971), os tipos de células encontradas normalmente na conjuntiva são fibroblastos, macrófagos, mastócitos, leucócitos polimorfonucleares, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos; na córnea são encontrados ceratócitos, linfócitos, macrófagos e raros neutrófilos. Alves et al. (1996), em um estudo dos efeitos do uso tópico da mitomicina C no epitélio corneano de coelhas, encontraram neutrófilos, eosinófilos e raros plasmócitos no grupo experimental. Em outros trabalhos com o uso da mitomicina C, foi observada ausência de células inflamatórias na conjuntiva bulbar com o uso de água destilada; no grupo-experimental foi observado infiltrado inflamatório constituído principalmente de neutrófilos e eosinófilos (Alves, Bignardi, 1997; Holzchuh et al., 1997). No presente estudo, o tipo de células encontrado foi de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Há coincidência, portanto, com a literatura e diferença apenas quanto à presença de linfócitos.

Quanto à NVC corneana, o Avastin® mostrou efeito inibitório quando se comparou o grupo-experimental com o grupo-controle, no qual se utilizou o SF. Entretanto, quando se comparou o grupo de instilação com o grupo de injeção do Avastin®, não houve diferença estatisticamente significativa. Este dado fornece subsídios para a escolha da via tópica como via de administração, já que é de fácil aplicação, não é invasiva e, portanto, resulta em menos complicações (Yoeruek et al., 2007) que as provocadas pela injeção.

Na NVC corneana, em que o VEGF desempenha papel importante (Deutsch, Hughes, 1979; Dell et al., 2006; Jo et al., 2006), vários fatores estão implicados. Portanto, drogas anti-VEGF podem diminuir a formação de neovasos na córnea, como diversos

trabalhos têm mostrado. Manzano et al. (2007) utilizaram o Avastin® por via tópica (duas vezes ao dia por sete dias) em um estudo experimental em olhos de ratos após queimadura corneana para observar o efeito da droga na neovascularização. Os resultados mostraram que o Avastin® inibe a neovascularização da córnea, apesar desta inibição não ter sido completa (Manzano et al., 2007). Barros e Belfort Junior (2007) utilizaram o Avastin® por via subconjuntival em um estudo com ratos e os resultados sugeriram que esta droga é capaz de inibir a angiogênese corneal.

Em um estudo em olhos de coelhos, Yoeruek et al. (2007) utilizaram o bevacizumabe por via tópica. Este estudo mostrou efeito benéfico do Avastin® sobre a neovascularização e a opacidade corneana. Também, Hosseini et al. (2007) estudaram o efeito da injeção subconjuntival de 2,5 mg de bevacizumabe (em duas aplicações, às 6 horas e às 12 horas, totalizando 5 mg) na neovascularização de olhos de coelhos após queimadura com hidróxido de sódio. O efeito foi significativo na inibição da neovascularização.

Estes dados coincidem com os do presente trabalho.

Neste estudo, como em outros já publicados (Hosseini et al., 2007; Manzano et al., 2007), a inibição da NVC corneana não foi completa (apenas em um animal foi completa, no grupo da instilação da droga). Uma explicação poderia ser o fato do Avastin® agir especificamente no VEGF e outros fatores estarem implicados na NVC da córnea, como o bFGF (fator básico de crescimento do fibroblasto) (Gane et al., 2004; Jo et al., 2006), PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta) e angiopoetinas 1 e 2 (Dell et al., 2006; Jo et al., 2006). Outras possibilidades são que o bevacizumabe, sendo um anticorpo humanizado, não é espécie-específico para coelhos (Yoeruek et al., 2007) e, portanto, com um menor potencial de ação neles; e a dose pode ter sido insuficiente para a inibição completa da NVC corneana (Hosseini et al., 2007; Manzano et al., 2007).

Quanto à inibição apenas do VEGF pelo Avastin®, Hosseini et al. (2007) sugerem que uma combinação de outros medicamentos pode levar a um melhor resultado. Jo et al. (2006) mostraram que a inibição concomitante do VEGF-A e do PDGF-B é mais efetiva do que apenas a do VEGF-A. Cada vez mais, o conceito de terapia combinada interessa à comunidade científica oftalmológica e a co-administração de dois agentes antiangiogênicos tem-se mostrado promissor nos tratamentos de doenças oculares, como já vem ocorrendo na oncologia e na imunologia (Afzal et al., 2007).

Recentemente uma nova droga tem sido testada na neovascularização ocular. Trata-se do VEGF Trap, um bloqueador específico que se liga e inativa o VEGF no

sangue e nos espaços extravascular e extracelular, através da formação de um complexo imune estável, que otimiza as propriedades farmacocinéticas e a alta afinidade com o VEGF A (Rudge et al., 2007). O estudo do efeito do VEGF Trap por via subcutânea em queimadura química corneana em olhos de ratos mostrou efeito benéfico na NVC com inibição da formação de neovasos até 4 semanas após o término do tratamento, além de redução do edema e da inflamação corneana (Bayer Health Care, 2007).

Outra modalidade de investigação tem sido a pesquisa de fatores reguladores da angiogênese denominados de reguladores “mestres”, assim chamados por desempenharem um papel crucial no início da cadeia de eventos da angiogênese, podendo agir simultaneamente na modulação da atividade de vários mediadores angiogênicos. Pode-se citar como exemplo o fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF- α) e a proteína quinase CK2. Estes reguladores mestres são alvos promissores para os novos tratamentos oculares (Afzal et al., 2007).

Housseini e Nejabat (2007) propuseram o uso tópico de agentes anti-VEGF em NVC corneana em situações como queimadura por álcalis, infecção, deficiência de células germinativas, ceratite estromal e rejeição de transplante corneano. Entretanto, estes autores preconizam o teste em animais antes da aplicação clínica destes agentes anti-VEGF. Alguns relatos de casos clínicos mostraram o efeito benéfico do uso tópico e subconjuntival do Avastin® em NVC corneana causada por deficiência de células germinativas (por queimaduras por álcalis e por hereditariedade) e por rejeição de transplante corneano (Awadein, 2007; Bock et al., 2007). Mas, estudos clínicos controlados são necessários para melhor avaliar a eficiência do Avastin® na superfície ocular em doenças conjuntivais e corneanas.

Importante ressaltar que estas pesquisas mais recentes remontam para a biologia celular com a intenção de descobrir elementos cada vez mais específicos e mais seletivos, portanto, com melhores resultados e menor agressão aos tecidos sadios.

O mérito deste trabalho reside no fato de que, além de documentar experimentalmente que o uso tópico e subconjuntival do Avastin® não causou toxicidade para a superfície ocular, compara o efeito da via tópica de administração com a via subconjuntival desta droga na NVC corneana de olhos de coelhos após queimadura química e mostra que não houve diferença entre elas na inibição da NVC.

6 CONCLUSÃO

- Não houve toxicidade do uso tópico e da injeção subconjuntival do bevacizumab (avastin®) na superfície ocular íntegra (conjuntiva e córnea) de olhos de coelhos;
- O bevacizumab (avastin®) apresentou efeito inibitório na NVC corneana de olhos de coelhos após queimadura química, independente da via utilizada (tópica ou via subconjuntival).

REFERÊNCIAS

- Afzal A, Shaw LC, Ljubimov AV, Boulton ME, Segal MS, Grant MB. Retinal and choroidal microangiopathies: therapeutic opportunities. *Microv. Res.* 2007; 74: 131-144.
- Alves MR, Bignardi TH. Efeitos do uso tópico da Mitomicina C na superfície conjuntival de coelhos. *Rev Bras Oftal.* 1997; 56 (6): 387-393.
- Alves MR, Lui Netto A, Gomes JAP. Tratamento clínico. In: Gomes JAP, Pires RTF, Alves MR, Netto AL. *Doenças da superfície ocular: diagnóstico e tratamento.* Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2002. cap. 5, p. 60-79.
- Alves MR, Saldiva PHN, Lemos M, José NK. Efeitos do uso tópico da mitomicina C no epitélio corneano de coelhas: análise histopatológica pela morfometria. *Arq Bras Oftalmol.* 1996 out; 59 (5): 431-437.
- Awadein A. Subconjunctival bevacizumab for vascularized rejected corneal grafts. *J Cataract Refract Surg.* 2007 Nov; 33 (11): 1991-3.
- Bayer Health Care. VEGF Trap-Eye: intravitreal administration in neovascular age-related macular degeneration. Investigator's Brochure, Sep. 2007; 1: 1-89.
- Barouch FC, Miller JW. Potential future targets for treating ocular neovascularization. *Ophthalmol Clin N Am.* 2006 Sept; 19 (3): 401-9.
- Barros LF, Belfort Junior R. The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) on angiogenesis in the rat cornea. *An Acad Bras Cienc.* 2007 Sep; 79 (3): 389-94.
- Bock F, König Y, Kruse F, Baier M, Cursiefen C. Bevacizumab (Avastin) eye drops inhibit corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008 Feb; 246 (2): 281-4.
- Boteon JE, Ferreira Filho N. Histologia da córnea. In: Kara-Jose N, Freitas D, Moreira H, Boteon JE. *Doenças da córnea e conjuntiva.* Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2007. cap. 2, p. 9-16.
- Burstein NL. Corneal cytotoxicity of topically applied drugs, vehicles and preservatives. *Surv Ophthalmol.* 1980; 25 (1): 15-30.
- Campos ES. O ciclo celular. In: Rossi BM, Pinho M. *Genética e biologia molecular para o cirurgião.* São Paulo: Lemar; 1999. cap. 4, p. 63-64.
- Campos M. Cirurgia ceratorrefrativa a laser. In: Alves MR, Chamon W, Nosé W, editors. *Cirurgia refrativa.* Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2003. cap. 20, p. 281--300.
- Canadian Council on Animal Care. *Guide to the care and use of experimental animals.* Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1984. v. 1.
- Carpenter CP, Smith HF. Chemical burns of the rabbit cornea. *Am J Ophthamol.* 1946; 29: 1363-1372.

- Chambers WA, Green S, Gupta KC, Hill RN, Huntley K, Hurley PM, et al. Scoring for eye irritation tests. *Food Chem Toxicol*. 1993 Feb; 31 (2): 111-5.
- Cole N, Hume EB, Jalbert I, Vijay AK, Krishnan R, Willcox MD. Effects of topical administration of 12-methyl tetradecanoic acid (12-MTA) on the development of corneal angiogenesis. *Angiogenesis*. 2007; 10: 47-54.
- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos na experimentação animal. São Paulo: COBEA; 1991.
- Collan Y. Morphometry in pathology: another look at diagnostic histopathology. *Pathol Res Pract*. 1984 Nov; 179 (2): 189-92.
- Connors MS, Urbano F, Vafeas C, Stoltz RA, Dunn MW, Schwartzman ML. Alkali burn-induced synthesis of inflammatory eicosanoids in rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997 Sep; 38 (10): 1963-71.
- Consumer Product Safety Commission. Test for eye irritants: food and drugs administration. Massachusetts; 1990.
- Contran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflamação e reparação. In: Contran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia estrutural e funcional*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. cap. 3, p. 45-83.
- Dantas AM. Anatomia, histologia e fisiologia. In: Dantas AM. *Clínica oftalmológica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1980. cap 2, p. 31-110.
- De Luca RR, Alexandre SR, Marques T. *Manual para técnicos em bioterismo*. 2. ed. São Paulo: EPM; 1996.
- Dell S, Peters S, Muther P, Kociok N, Jousen AM. The role of PDGF receptor inhibitors and PI3-kinase signaling in the pathogenesis of corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 May; 47 (5): 1928-37.
- Deutsch TA, Hughes WF. Suppressive effects of indomethacin on thermally induced neovascularization of rabbit corneas. *Am J Ophthalmol*. 1979 Apr; 87 (4): 536-540.
- Erdurmus M, Yagci R, Yilmaz B, Hepsen IF, Turkmen C, Aydin B, et al. Inhibitory effects of topical thymoquinone on corneal neovascularization. *Cornea*. 2007 July; 26 (6): 715-9.
- Feher O. Bevacizumabe: um novo componente no tratamento de tumores sólidos. *Diálogo Cient*. 2006 jan; 4 (1): 19.
- Feiner L, Barr EE, Shui YB, Holekamp NM, Brantley MA Jr. Safety of intravitreal injection of bevacizumab in rabbit eyes. *Retina*. 2006 Oct; 26(8): 882-8.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*. 2002 Dec; 29 (6 Suppl 16): 10-4.
- Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2004 Jul; 112 (7-8): 496-507.

Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing. *Acta Ophthalmol Scand.* 2004 Oct; 82 (5): 557-63

Gan L; Fagerholm P. Leukocytes in the early events of corneal neovascularization. *Cornea.* 2001 Jan; 20 (1):96-9.

Genentech. Avastin full prescribing information. Disponível na Internet. URL: <http://www.gene.com/gene/products/information/pdf/avastin-prescribing.pdf>. Capturado em 20/02/2008.

Gomes JAP, Gueiros MB. Anatomia e fisiologia da córnea. In: Alves MR, Chamon W, Nosé W. *Cirurgia refrativa.* Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2003. cap. 8, p. 97-123

Gomes JAP, Pires RTF. Aspectos anatômicos e fisiológicos da superfície ocular e filme lacrimal. In: Gomes JAP, Pires RTF, Alves MR, Lui Netto A. *Doenças da superfície ocular: diagnóstico e tratamento;* 2002. cap. 1, p. 3-16.

Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J.* 2005; 81: 236-242.

Gupta S, Schiavo DM. A rapid testing procedure to determine low levels of ocular irritations. *Lab Anim Sic.* 1976 jun; 26 (3): 468-472.

Hepsen IF, Er H, Çekiç O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. *Ophthalmic Res.* 1999; 31 (6): 426-31.

Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. *Histology of the human eye.* Philadelphia: W.B. Saunders; 1971. Cap. 4, p. 112-180.

Holzchuh N, Alves MR, Santo RM, Matayoshi S, Kara-José N. Efeitos do uso do colírio de mitomicina C na superfície ocular de coelhos. *Rev Med (São Paulo).* 1997; 76 (6): 303-306.

Holzchuh N, Holzchuh R, Arieta CEL, Kara-José N, Alves MR. Toxicidade da mitomicina C no epitélio corneano de coelhos. *Arq Bras Oftalmol.* 2004 set; 67 (5): 713-6.

Hosseini H, Nejabat M, Mehryar M, Yazdchi T, Sedaghat A, Noori F. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007 Nov; 35 (8): 745-8.

Hosseini H, Nejabat M. A potential therapeutic strategy for inhibition of corneal neovascularization with new anti-VEGF agents. *Med Hypotheses.* 2007; 68 (4): 799-801.

Jo N, Mailhos C, Ju M, Cheung E, Bradley J, Nishijima K, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Am J Pathol.* 2006 Jun;168 (6): 2036-53.

Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res.* 2000; 70: 419-28

Lacerda CAM. *Métodos quantitativos em morfologia.* Rio de Janeiro: Eduerj; 1995.

Lipman RM, Epstein RJ, Hendricks RL. Suppression of corneal neovascularization with cyclosporine. *Arch Ophthalmol*. 1992 Mar; 110 (3): 405-7.

Maffei WE. Os agents quimicos como causas de docenças. In: Maffei We. Os fundamentos da medicina. São Paulo: Artes Médicas; 1978. Cap 7, p. 777.

Mahoney JM, Waterbury D. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Curr Eye Res*. 1985; 4 (5): 531-5.

Manzano R, Peyman G, Khan P, Carvounis P, Kivilcim M, Ren M, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol*. 2007 Jun; 91 (6): 804-7.

Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab. *Retina*, 2006 Mar; 26 (3): 257-61.

MediRabbit. Analgesics drugs for use in rabbits. Disponível na Internet. URL: <http://www.medirabbit.com>. Capturado em 02/02/2007.

Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology*. 2005 Jun; 112 (6): 1035-47.

Organization for Economic Cooperation and Development. Test N°. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 1997 Jul; 1(4): 1.

Power WJ, Neves RA. Anatomia e fisiologia da córnea. In: Belfort Júnior R, Kara-José N. *Córnea clínica - cirúrgica*. São Paulo: Roca; 1996. cap. 1, p. 1-16.

Riazi-Esfahani M, Peyman GA, Aydin E, Kazi AA, Kivilcim M, Sanders DR. Prevention of corneal neovascularization: evaluation of various commercially available compounds in an experimental rat model. *Cornea*. 2006 Aug; 25 (7): 801-4.

Roche. Avastin (Bevacizumabe). Disponível na Internet. URL: <http://www.roche.com.br>. Capturado em 20/02/2007.

Rodrigues EB, Rossi EE, Grumann Junior A, Meyer CH, Ho AC. Tratamento da forma neovascular de degeneração macular relacionada à idade com drogas antiangiogênicas. *Arq Bras Oftalmol*. 2006; 69 (5): 756-65.

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 Jul; 36 (4): 336-9.

Rudge JS, Holash J, Hylton D, Russell M, Jiang S, Leidich R, et al. VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov; 104 (47): 18363-70.

Schwartz DM, Fields HL, Duncan KG, Duncan JL, Jones MR. Experimental study of tetrodotoxin, a long-acting topical anesthetic. *Am J Ophthalmol*. 1998 Apr; 125 (4): 481-7.

Shahar J, Avery RL, Heilweil G, Barak A, Zemel E, Lewis GP, et al. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab. *Retina*. 2006 Mar; 26 (3): 262-9.

Springer JA, Chambers WA, Green S, Gupta KC, Hill RN, Hurley PM, et al. Number of animals for sequential testing. *Food Chem Toxicol*. 1993 Feb; 31 (2): 105-9.

Sun R, Hamilton RC, Gimbel HV. Comparison of 4 topical anesthetic agents for effect and corneal toxicity in rabbits. *J Cataract Refract Surg*. 1999 Sep; 25 (9): 1232-6.

van Praag E. The ultimate rabbit medicine resource on the Net. Disponível na Internet. URL: <http://www.medirabbit.com>. Capturado em 25/07/2007.

van Wijngaarden P, Coster DJ, Williams KA. Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems [commentary]. *Jama*. 2005 Mar; 293 (12): 23-30.

Wilhelmus KR. The Draize eye test. *Surv Ophthalmol*. 2001 May-Jun; 45 (6): 493-515.

Yaylali V, Ohta T, Kaufman S, Maitchouk DY, Beuerman RW. In vivo confocal imaging of corneal neovascularization. *Cornea*. 1998; 17 (6): 646-653.

Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, Tatar O, Tura A, Grisanti S, et al. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol Scand*. 2007 Nov 8 [Epub ahead of print].

Zhang Z, Ma J, Gao G, Li C, Luo L, Zhang M, et al. Plasminogen kringle 5 inhibits alkali-burn-induced corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Nov; 46 (11): 4062-71.

Zondor SD, Medina PJ. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor with efficacy in colorectal and other malignancies. *Ann Pharmacother*. 2004 Jul-Aug; 38 (7-8): 1258-64.

BIBLIOGRAFIA

- Amano S, Roban R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound and inflammation related corneal revascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 18-22.
- Augustin HG. Translating angiogenesis research into the clinic: the challenges ahead. *Br J Radiol.* 2003;76 (Spec n° 1): S3-S10.
- Bakri SJ, Snyder MR, Pulido JS, McCannel CA, Weiss WT, Singh RJ. Six-month stability of bevacizumab (Avastin) binding to vascular endothelial growth factor after withdrawal into a syringe and refrigeration or freezing. *Retina.* 2006 May-Jun; 26 (5): 519-22.
- Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russel M, et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Aug; 99 (17): 11393-8.
- Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol Nurs.* 2002 Dec; 29 (6): 3-9.
- Lee P, Wang CC, Adamis A. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv. Ophthalmol.* 1998 Nov; 43 (3): 245-69.
- Modjtahedi H. Molecular therapy of head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 Jan; 24 (1): 129-146.
- Murata M, Shimizu S, Horiuchi S, Taira M. Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on corneal neovascularization. *Gaefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006; 244: 205-9.
- Peirong LU, Longbiao LI, Naofumi Mukaida, Xueguang Zhang. Alkali-Induced corneal Neovascularization is independent of CXCR2- mediated Neutrophil infiltration. *Cornea.* 2007 Feb; 26 (2): 199-206.
- Seta F, Patil K, Bellner L, Mezentsev A, Kemp R, Dunn MW, Schwartzman ML. Inhibition of VEGF expression and corneal neovascularization by siRNA targeting cytochrome P450 4B1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007; 84: 116-27.
- Spitzer MS, Wallenfels-Thilo B, Sierra A, Yoeruek E, Peters S, Henke-Fahle S, et al. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol.* 2006 Oct; 90 (10): 1316-21.
- Wachsberger PR, Burd R, Cardic C, Thakur M, Daskalakis C, Holasch J, et al. VEGF trap in combination with radiotherapy improves tumor control in u87 glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Apr 1;67(5):1526-37.
- Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, Aisenbrey S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Safety profile of Bevacizumab on cultured human corneal cells. *Cornea.* 2007; 26 (8): 977-82.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabelas mostrando os resultados obtidos nas diversas fases do experimento, etapa 1 e 2.

Tabela A₁ – Resultado da avaliação do exame externo dos olhos dos coelhos, pela escala de graduação dos efeitos oculares, após instilação do SF e do Avastin®.

Tempo/ Produto		Escore 0 n° de olhos(%)	Escore 1 n° de olhos (%)	Escore 2 n° de olhos (%)	Total n° de olhos (%)
1ª. hora	SF	1(6,25)	15(93,75)	0(0)	16(100)
	AV	0(0)	23(95,83)	1(4,17)	24(100)
1ª. dia	SF	1(8,33)	10(83,34)	1(8,33)	12(100)
	AV	1(5,55)	16(88,90)	1(5,55)	18(100)
2ª. dia	SF	2(25)	6(75)	0(0)	08(100)
	AV	4(33,33)	8(66,87)	0(0)	12(100)
3ª. dia	SF	1(25)	3(75)	0(0)	4(100)
	AV	2(33,33)	4(66,67)	0(0)	6(100)

SF= Soro fisiológico

AV= Avastin®

Tabela A₂ – Resultado da contagem de células inflamatórias realizada na conjuntiva e na córnea nos olhos dos coelhos após uma hora de instilação do SF e do Avastin®.

Coelho/Olho	Hora/Dia	Produto	Número células na conjuntiva	Número células na córnea	
01	OD	1ª. hora	SF	58	42
	OE	1ª. hora	SF	57	12
02	OD	1ª. hora	AV	107	12
	OE	1ª. hora	SF	68	8
03	OD	1ª. hora	AV	17	15
	OE	1ª. hora	SF	28	8
04	OD	1ª. hora	AV	-	23
	OE	1ª. hora	AV	-	0
05	OD	1ª. hora	AV	109	59
	OE	1ª. hora	AV	140	5

SF = Soro fisiológico

AV = Avastin®

(-) = extravio

Tabela A₃ – Resultado da contagem de células inflamatórias realizada na conjuntiva e na córnea no primeiro dia após a instilação do SF e do Avastin®.

Coelho/Olho	Hora/Dia	Produto	Número células na conjuntiva	Número células na córnea	
06	OD	1 ^a . dia	SF	73	126
	OE	1 ^a . dia	SF	63	27
07	OD	1 ^a . dia	AV	15	7
	OE	1 ^a . dia	SF	2	7
08	OD	1 ^a . dia	AV	31	3
	OE	1 ^a . dia	SF	19	22
09	OD	1 ^a . dia	AV	112	3
	OE	1 ^a . dia	AV	219	10
10	OD	1 ^a . dia	AV	37	4
	OE	1 ^a . dia	AV	111	37

SF = Soro fisiológico

AV = Avastin®

Tabela A₄ – Resultado da contagem de células inflamatórias realizada na conjuntiva e na córnea no segundo dia após a instilação do SF e do Avastin®.

Coelho/Olho	Hora/Dia	Produto	Número células na conjuntiva	Número células na córnea	
11	OD	2 ^a . dia	SF	78	38
	OE	2 ^a . dia	SF	32	25
12	OD	2 ^a . dia	AV	-	9
	OE	2 ^a . dia	SF	2	5
13	OD	2 ^a . dia	AV	72	7
	OE	2 ^a . dia	SF	37	0
14	OD	2 ^a . dia	AV	44	13
	OE	2 ^a . dia	AV	-	12
15	OD	2 ^a . dia	AV	45	23
	OE	2 ^a . dia	AV	44	20

SF = Soro fisiológico

AV = Avastin®

(-) = extravio

Tabela A₅ – Resultado da contagem de células inflamatórias realizada na conjuntiva e na córnea no terceiro dia após a instilação do SF e do Avastin®.

Coelho/Olho	Hora/Dia	Produto	Número células na conjuntiva	Número células na córnea	
16	OD	3 ^a . dia	SF	28	16
	OE	3 ^a . dia	SF	24	18
17	OD	3 ^a . dia	AV	17	87
	OE	3 ^a . dia	SF	6	4
18	OD	3 ^a . dia	AV	19	2
	OE	3 ^a . dia	SF	23	13
19	OD	3 ^a . dia	AV	79	14
	OE	3 ^a . dia	AV	37	32
20	OD	3 ^a . dia	AV	44	3
	OE	3 ^a . dia	AV	18	28

SF = Soro fisiológico

AV = Avastin®

Tabela A₆ - Resultado da avaliação do exame externo nos olhos dos coelhos, pela escala de graduação dos efeitos oculares, após injeção do SF e do Avastin®.

Tempo/ Produto		Escore 0	Escore 1	Escore 2	Total
		n° de olhos(%)	n° de olhos (%)	n° de olhos (%)	n° de olhos (%)
1 ^a . hora	SF	0(0%)	15(93,75)	1(6,25)	16(100)
	Avastin®	0(0)	24(100)	0(0)	24(100)
1 ^a . dia	SF	1(8,33%)	10(83,34)	1(8,33)	12(100)
	Avastin®	1(5,55)	17(94,45)	0(0)	18(100)
2 ^a . dia	SF	0(0)	8(100)	0(0)	8(100)
	Avastin®	2(16,67)	10(83,33)	0(0)	12(100)
3 ^a . dia	SF	0(0)	4(100)	0(0)	4(100)
	Avastin®	2(33,33)	4(66,67)	0(0)	6(100)

SF= Soro fisiológico

Tabela A₇ – Resultado da contagem de células inflamatórias realizada na conjuntiva e na córnea após uma hora de injeção do SF e do Avastin®.

Coelho/Olho	Hora/Dia	Produto	Número células na conjuntiva	Número células na córnea	
01	OD	1 ^a . hora	SF	77	0
	OE	1 ^a . hora	SF	35	0
02	OD	1 ^a . hora	AV	28	32
	OE	1 ^a . hora	SF	34	3
03	OD	1 ^a . hora	AV	51	6
	OE	1 ^a . hora	SF	36	20
04	OD	1 ^a . hora	AV	60	2
	OE	1 ^a . hora	AV	99	9
05	OD	1 ^a . hora	AV	59	0
	OE	1 ^a . hora	AV	92	0

SF = Soro fisiológico

AV = Avastin®

Tabela A₈ – Resultado da contagem de células inflamatórias realizada na conjuntiva e na córnea no primeiro dia após a injeção do SF e do Avastin®.

Coelho/Olho	Hora/Dia	Produto	Número células na conjuntiva	Número células na córnea	
06	OD	1 ^a . dia	SF	55	0
	OE	1 ^a . dia	SF	36	0
07	OD	1 ^a . dia	AV	66	0
	OE	1 ^a . dia	SF	33	0
08	OD	1 ^a . dia	AV	72	0
	OE	1 ^a . dia	SF	45	0
09	OD	1 ^a . dia	AV	61	0
	OE	1 ^a . dia	AV	62	0
10	OD	1 ^a . dia	AV	44	0
	OE	1 ^a . dia	AV	76	0

SF = Soro fisiológico

AV = Avastin®

Tabela A₉ – Resultado da contagem de células inflamatórias realizada na conjuntiva e na córnea no segundo dia após a injeção do SF e do Avastin®.

Coelho/Olho	Hora/Dia	Produto	Número células na conjuntiva	Número células na córnea	
11	OD	2 ^a . dia	SF	29	1
	OE	2 ^a . dia	SF	111	0
12	OD	2 ^a . dia	AV	36	0
	OE	2 ^a . dia	SF	51	1
13	OD	2 ^a . dia	AV	39	0
	OE	2 ^a . dia	SF	78	0
14	OD	2 ^a . dia	AV	38	0
	OE	2 ^a . dia	AV	59	0
15	OD	2 ^a . dia	AV	21	0
	OE	2 ^a . dia	AV	69	0

SF = Soro fisiológico

AV = Avastin®

Tabela A₁₀ – Resultado da contagem de células inflamatórias realizada na conjuntiva e na córnea no terceiro dia após a injeção do SF e do Avastin®.

Coelho/Olho	Hora/Dia	Produto	Número células na conjuntiva	Número células na córnea	
16	OD	3 ^a . dia	SF	25	0
	OE	3 ^a . dia	SF	12	0
17	OD	3 ^a . dia	AV	28	0
	OE	3 ^a . dia	SF	37	0
18	OD	3 ^a . dia	AV	56	0
	OE	3 ^a . dia	SF	81	0
19	OD	3 ^a . dia	AV	39	0
	OE	3 ^a . dia	AV	73	0
20	OD	3 ^a . dia	AV	34	0
	OE	3 ^a . dia	AV	52	0

SF = Soro fisiológico

AV = Avastin®

APÊNDICE B

Escala de graduação dos efeitos oculares para anotação pelo examinador, etapa 1 e 2.

Escala de graduação dos efeitos oculares*.

DATA: _____ COELHO: ___ - ___ / ___°
 EXAME: PRÉ ___ PÓS ___ (uso da droga) ___ HORAS/DIAS APÓS uso da droga
 GRUPO: 1 – INSTILAÇÃO ___ OD: ___ OE: ___
 2 – INJEÇÃO ___ OD: ___ OE: ___

	OD		OE	
	EXT.	M.O.	EXT.	M.O.
<u>Córnea</u> –				
Sem ulceração ou opacidade – 0				
Áreas difusas de opacidade; detalhes da íris claramente visíveis – 1				
Áreas translúcidas facilmente distinguíveis; detalhes da íris levemente obscuros – 2				
Áreas de opalescência; detalhes da íris não visíveis; tamanho da pupila pobremente distinguível – 3				
Opacidade corneana total; íris não distinguível – 4				
<u>Irite</u> –				
Normal – 0				
Dobras profundas na íris, congestão, edema e injeção ciliar (qualquer um ou combinação de alguns destes); íris continua reagindo à luz (reação lenta) – 1				
Sem reação à luz, hemorragia e destruição (qualquer um ou todos) – 2				
<u>Vermelhidão da conjuntiva (conjuntiva palpebral e bulbar)</u>				
Vasos sanguíneos normais – 0				
Alguns vasos sanguíneos hiperêmicos – 1				
Mais difusa, coloração rubra; vasos individuais não facilmente visível – 2				
Difusa, vermelho “carne” – 3				
Resultado total = soma de todos resultados obtidos para a córnea, íris e conjuntiva				
Fluoresceína colírio (observação no Microscópio Cirúrgico): de 0 a ++++)				

Ext.: exame externo; M.O.: microscópio ótico

*Dr. Gerson Lopes – trabalho de pesquisa de doutorado – CCS/UEL.

APÊNDICE C

Escala de graduação dos efeitos oculares para anotação pelo examinador, etapa 3.

Terceira fase – QUEIMADURA/NEOVASCULARIZAÇÃO*

COELHOS 1 a 5 - 6 a 10 - 11 a 15 - 16 a 20.

Escala de graduação dos efeitos oculares – EXAME CLÍNICO GERAL.

DATA: _____ COELHO: ____ - ____ / ____°
 EXAME: PRÉ ___ PÓS ___ (uso da droga) ___ HORAS/DIAS APÓS uso da droga
 SUBGRUPO: 1 – INSTILAÇÃO SF OD: ___ OE: ___
 2 – INJEÇÃO SF OD: ___ OE: ___
 3 – INSTILAÇÃO DROGA OD: ___ OE: ___
 4 – INJEÇÃO DROGA OD: ___ OE: ___

	OD		OE	
	EXT.	M.O.	EXT.	M.O.
<u>Córnea</u> –				
Sem ulceração ou opacidade – 0				
Áreas difusas de opacidade; detalhes da íris claramente visíveis – 1				
Áreas translúcidas facilmente distinguíveis; detalhes da íris levemente obscuros – 2				
Áreas de opalescência; detalhes da íris não visíveis; tamanho da pupila pobremente distinguível – 3				
Opacidade corneana total; íris não distinguível – 4				
<u>Irite</u> –				
Normal – 0				
Dobras profundas na íris, congestão, edema e injeção ciliar (qualquer um ou combinação de alguns destes); íris continua reagindo à luz (reação lenta) – 1				
Sem reação à luz, hemorragia e destruição (qualquer um ou todos) – 2				
<u>Vermelhidão da conjuntiva (conjuntiva palpebral e bulbar)</u>				
Vasos sanguíneos normais – 0				
Alguns vasos sanguíneos hiperêmicos – 1				
Mais difusa, coloração rubra; vasos individuais não facilmente visível – 2				
Difusa, vermelho “carne” – 3				
Resultado total = soma de todos resultados obtidos para a córnea, íris e conjuntiva				
Fluoresceína colírio (observação no Microscópio Cirúrgico): de 0 a ++++)				

Ext.: exame externo; M.O.: microscópio ótico

APÊNDICE D

Escala de graduação do grau de neovascularização para anotação pelo examinador

Terceira fase – QUEIMADURA/NEOVASCULARIZAÇÃO*

COELHOS 1 a 5 - 6 a 10 - 11 a 15 - 16 a 20.

Escala de graduação dos efeitos oculares – EXAME DA NEOVASCULARIZAÇÃO.

DATA: _____ COELHO: ____ - ____ / ____°
 EXAME :PRÉ__ PÓS__ (uso da droga) ____ HORAS/DIAS APÓS uso da droga
 SUBGRUPO: 1 – INSTILAÇÃO SF – OD: ____ OE: ____
 2 – INJEÇÃO SF – OD: ____ OE: ____
 3 – INSTILAÇÃO DROGA – OD: ____ OE: ____
 4 – INJEÇÃO DROGA – OD: ____ OE: ____

<u>Córnea</u> – grau de neovascularização	Microscópio Cirúrgico
Sem vasos na córnea 0	
Vasos <1mm na córnea 1+	
Vasos de 1 a 1,9mm na córnea 2+	
Vasos de 2 a 2,9mm na córnea 3+	
Vasos ≥3mm na córnea 4+	
<u>Diâmetro corneano</u>	

*Dr. Gerson Lopes – trabalho de pesquisa de doutorado – CCS/UEL.

APÊNDICE E

Esquema elaborado para o examinador desenhar a neovascularização corneana

Terceira fase, GRUPO 3 – NEOVASCULARIZAÇÃO; Subgrupo 1,2,3,4*.

Escala de graduação dos efeitos oculares – EXAME DA NEOVASCULARIZAÇÃO

COELHO: _____

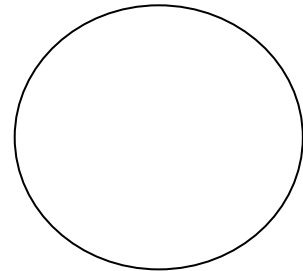
SUBGRUPO: 1 – INSTILAÇÃO SF – OD: ___ OE: ___

2 – INJEÇÃO SF – OD: ___ OE: ___

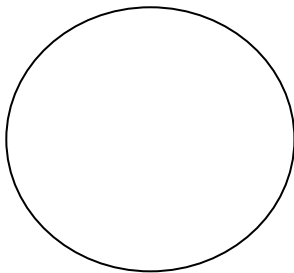
3 – INSTILAÇÃO DROGA – OD: ___ OE: ___

4 – INJEÇÃO DROGA – OD: ___ OE: ___

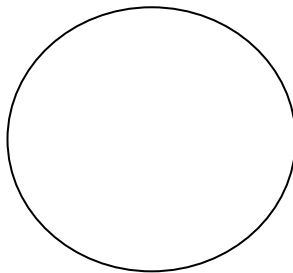
1º. DIA



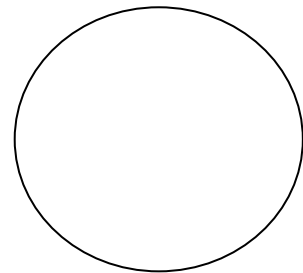
2º. DIA



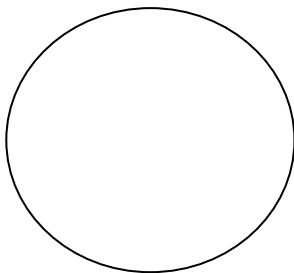
3º. DIA



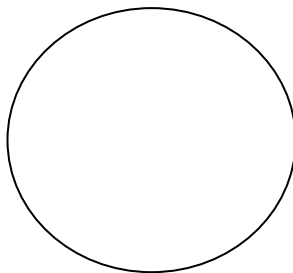
4º. DIA



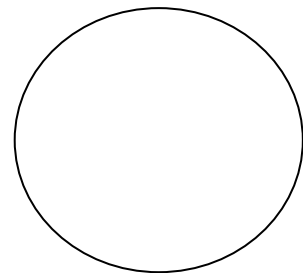
5º. DIA



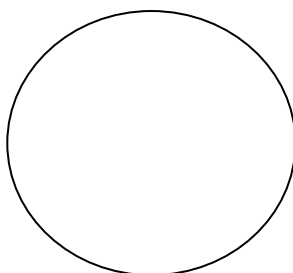
6º. DIA



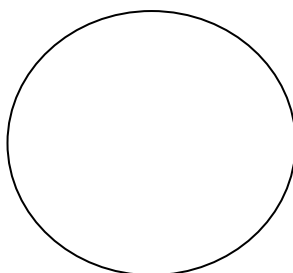
7º. DIA



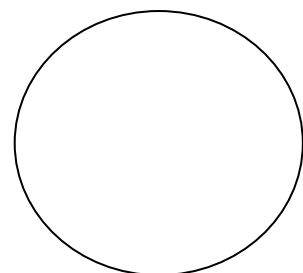
8º. DIA



9º. DIA



10º. DIA



APÊNDICE F

Fotos ilustrativas de alguns olhos dos coelhos da etapa 1

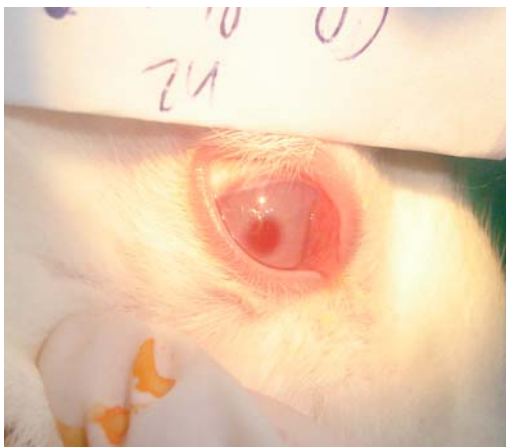
Figuras 1 a 5 - Fotos mostrando o coelho 18, olho direito (Avastin®); pré-experimento, 1^a hora, 1^o., 2^o. e 3^o. dia, respectivamente.



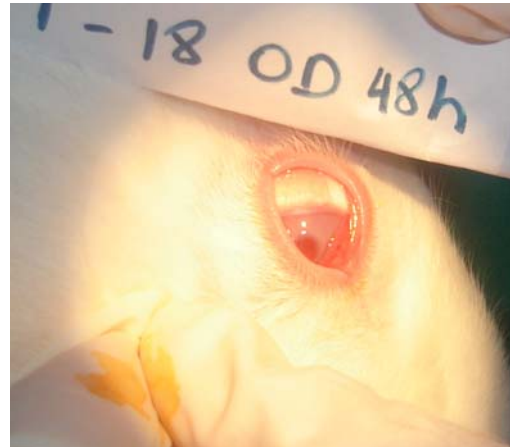
(1)



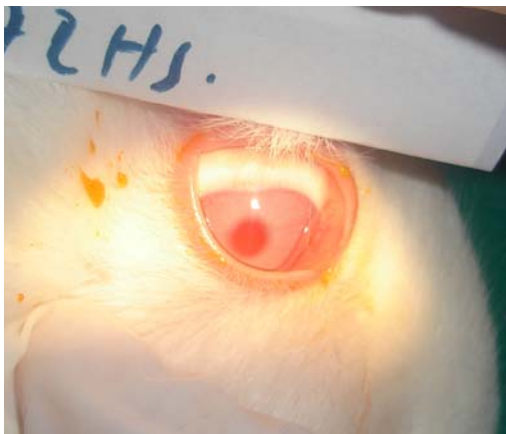
(2)



(3)



(4)

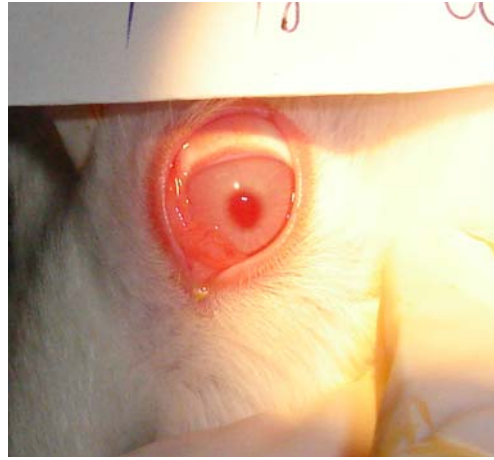


(5)

Figuras 6 a 10 - Fotos mostrando o coelho 18, olho esquerdo (SF); pré-experimento, 1ª hora, 1º, 2º. e 3º. dia, respectivamente.



(6)



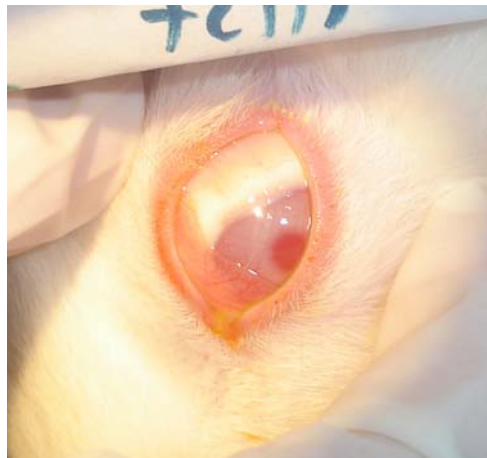
(7)



(8)



(9)

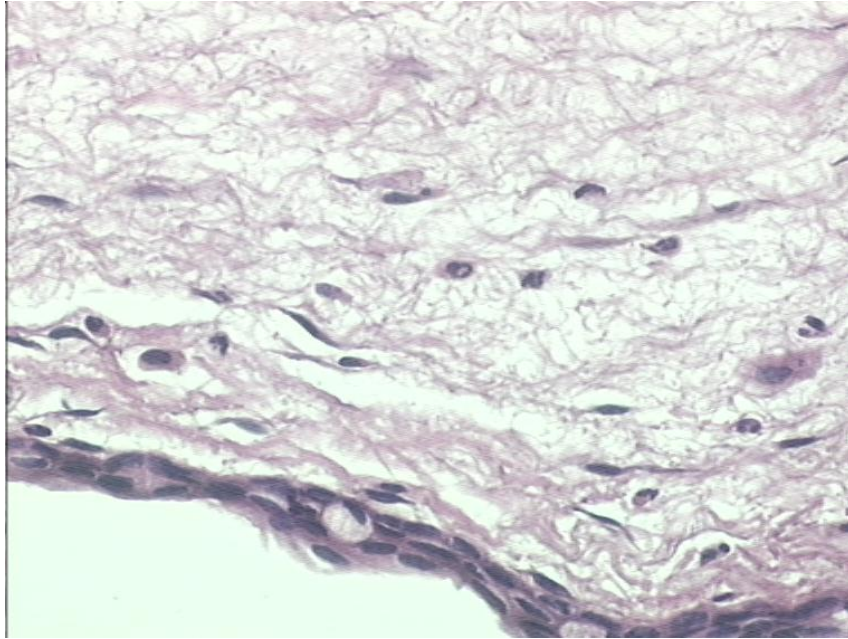


(10)

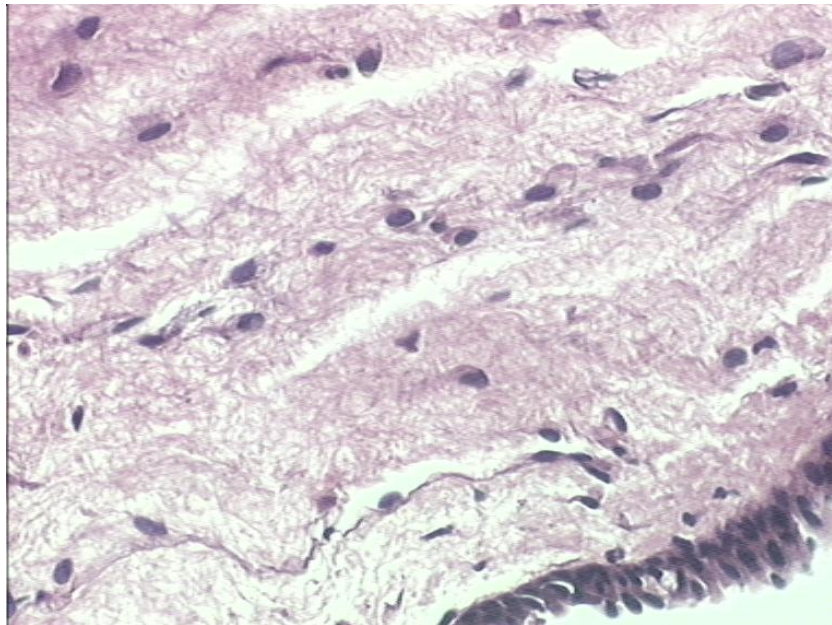
APÊNDICE G

Fotos do exame histopatológico da conjuntiva e da córnea, etapa 1 e 2.

Figuras 1 e 2 -Fotos do exame histopatológico da conjuntiva do OD (Avastin®) e do OE (SF) do coelho 7 da etapa 1, mostrando poucas células inflamatórias; corado com hematoxilina-eosina (100X).

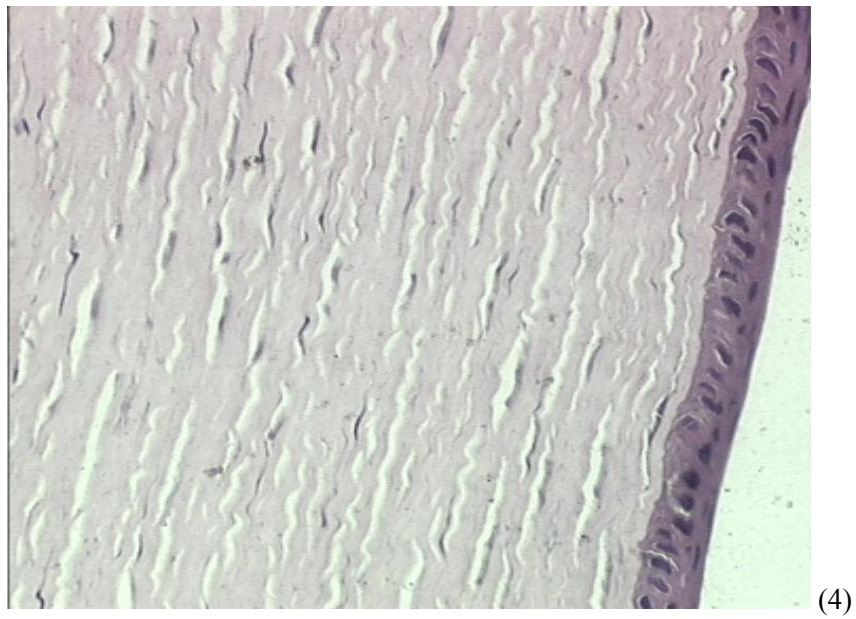
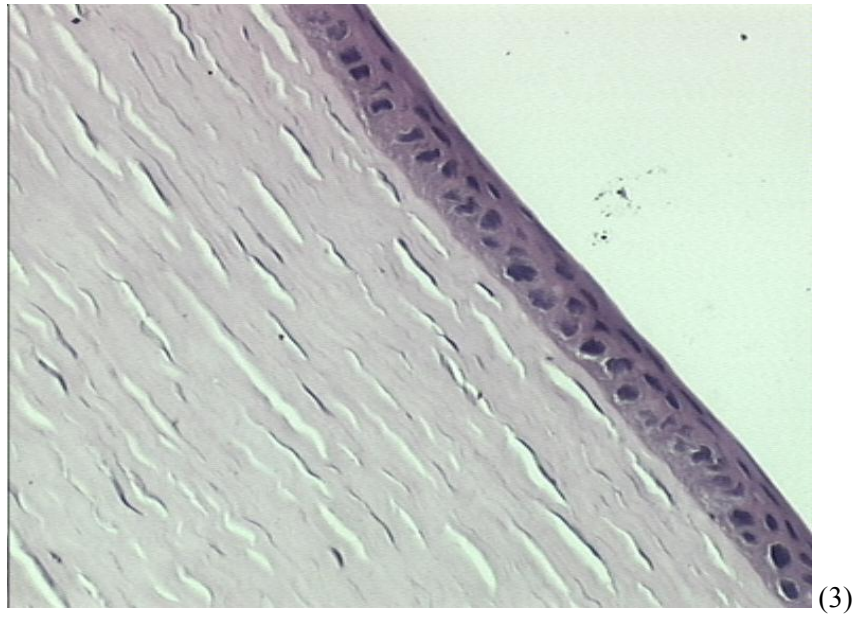


(1)

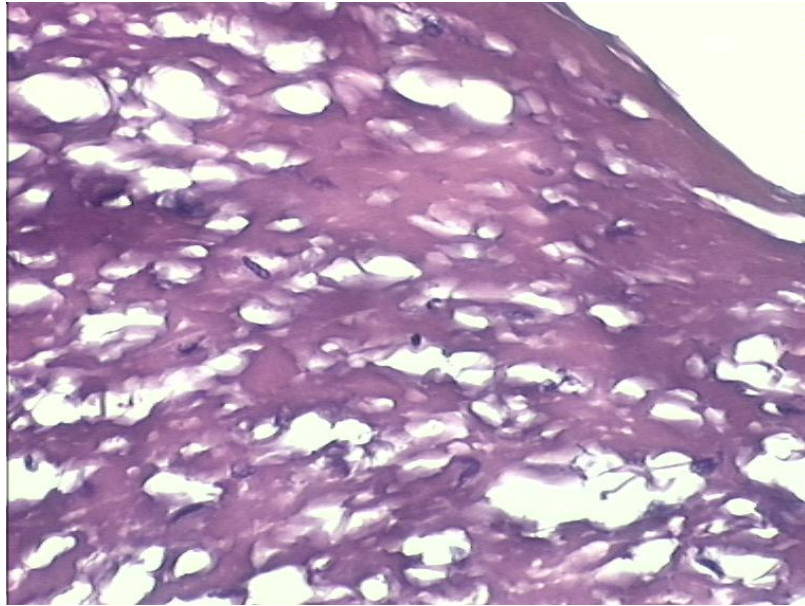


(2)

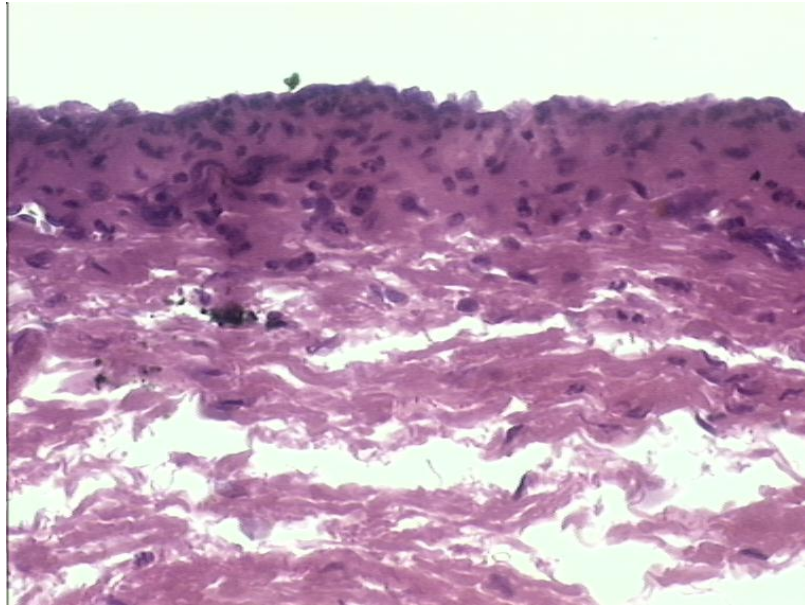
Figuras 3 e 4 - Fotos do exame histopatológico da córnea do OD (Avastin®) e do OE (SF) do coelho 12 da etapa 1, mostrando ausência de células inflamatórias; corado com hematoxilina-eosina (100X).



Figuras 5 e 6 - Fotos do exame histopatológico da conjuntiva do OD (Avastin®) e do OE (SF) do coelho 2 da etapa 2, mostrando poucas células inflamatórias; corado com hematoxilina-eosina (100X).

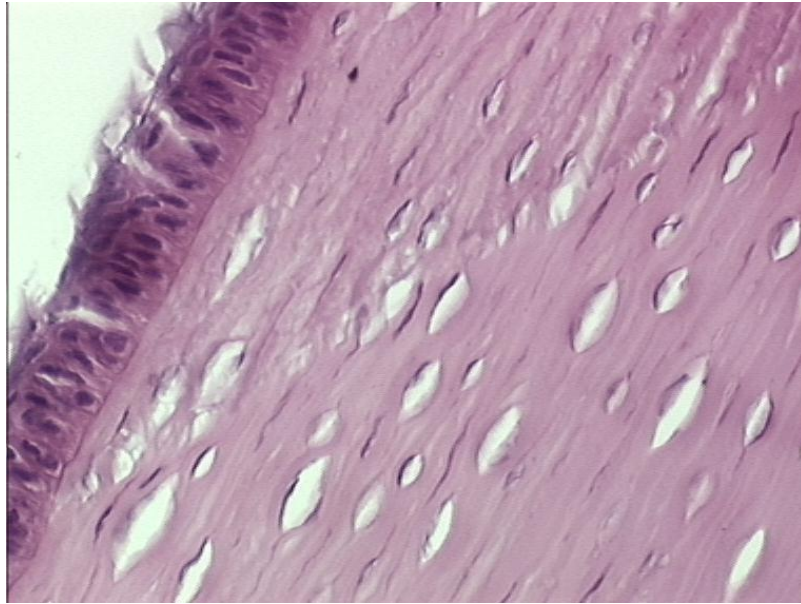


(5)

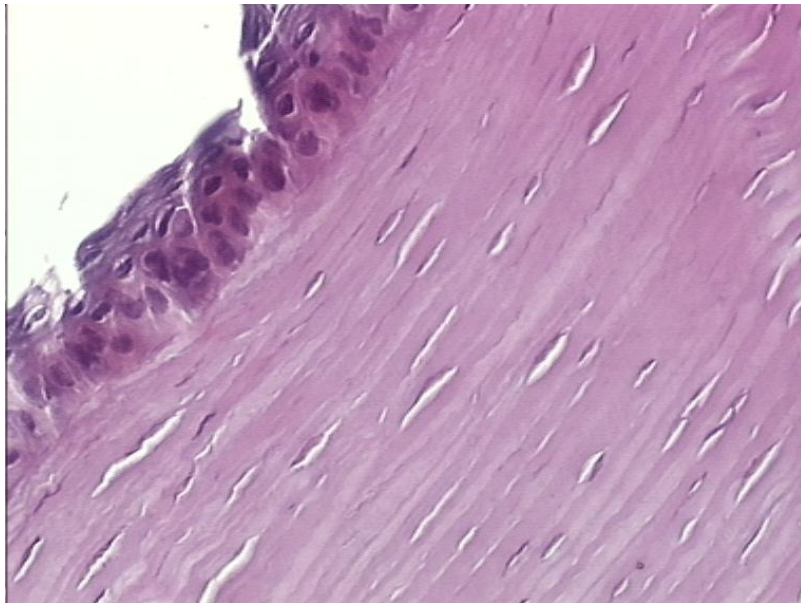


(6)

Figuras 7 e 8 - Fotos do exame histopatológico da córnea do OD (Avastin®) e do OE (SF) do coelho 2 da etapa 2, mostrando ausência de células inflamatórias; corado com hematoxilina-eosina (100X).



(7)



(8)

APÊNDICE H

Fotos ilustrativas do ambiente de experimentação e da etapa 3.

Figuras 1 e 2 - Fotos mostrando vista geral da sala experimentação do biotério e dos coelhos na gaiola de transporte do coelhário à sala de experimentação (5 coelhos por gaiola, no máximo).



(1)



(2)

Figuras 3 e 4 - Fotos mostrando balança para pesagem dos animais e o preparo para anestesia.



(3)

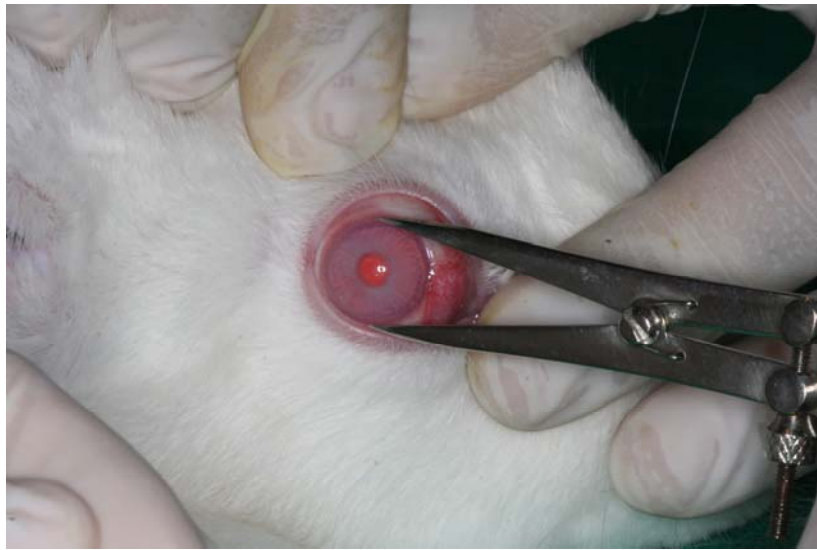


(4)

Figuras 5 e 6 - Fotos mostrando manobra para obter exoftalmia dos olhos dos coelhos para melhor registro fotográfico e medida do diâmetro corneano para auxiliar na conferência do cálculo da área corneana e de NVC; etapa 3.



(5)

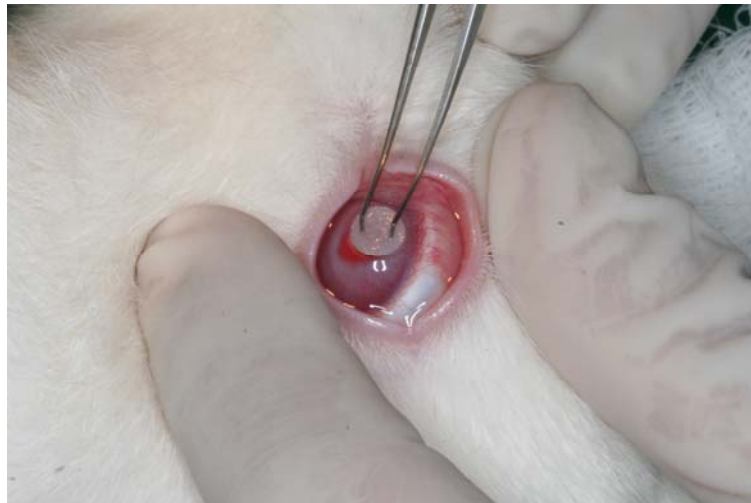


(6)

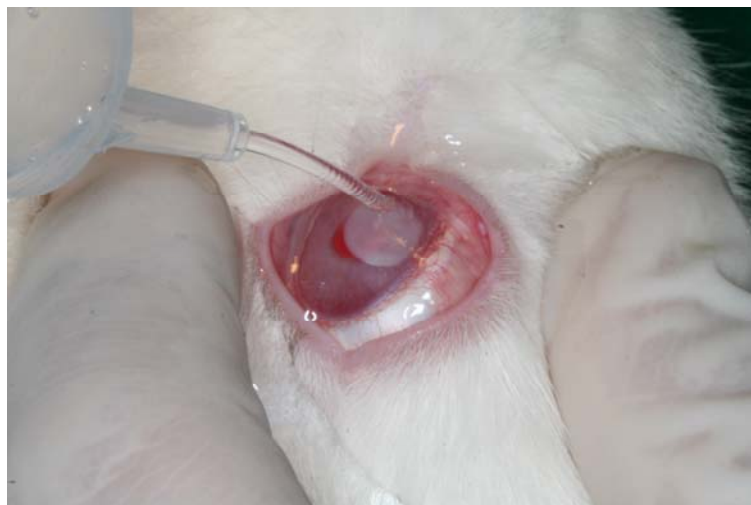
Figuras 7, 8 e 9 - Fotos mostrando a realização da queimadura corneana com círculo de papel filtro embebido em NaOH e a irrigação com SF; etapa 3.



(7)



(8)



(9)

Figuras 10 e 11 -Fotos mostrando a realização da injeção subconjuntival e o aspecto do olho após a injeção; etapa 3.

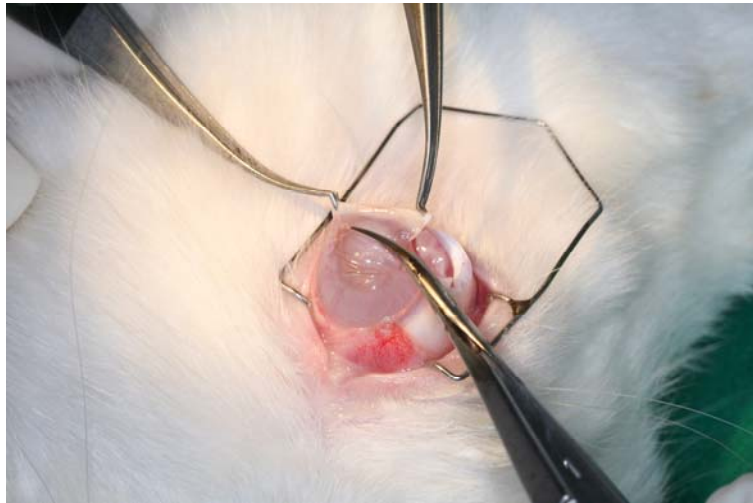


(10)

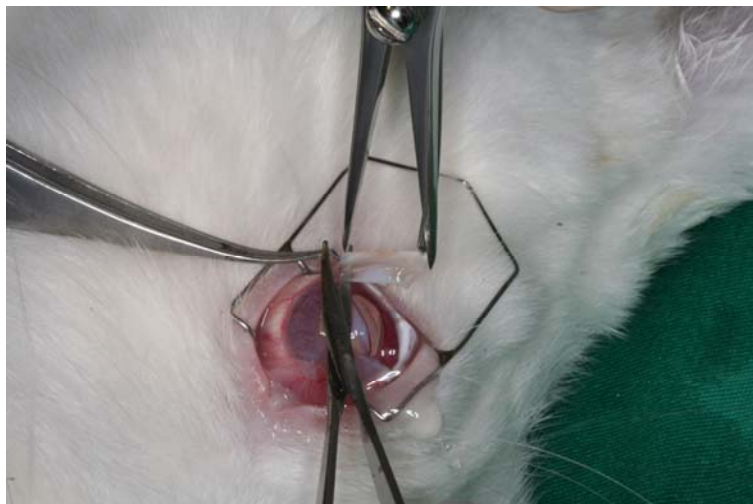


(11)

Figuras 12, 13 e 14 - Fotos mostrando a retirada do segmento corneano após o sacrifício dos animais e o segmento corneano retirado; etapa 3.



(12)

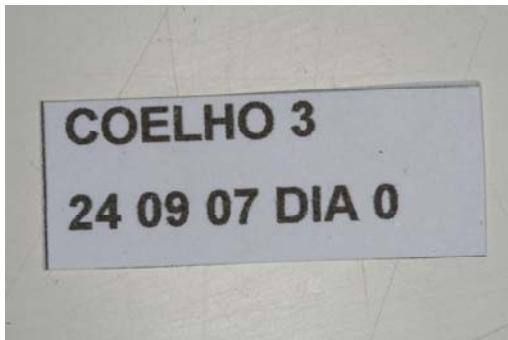


(13)

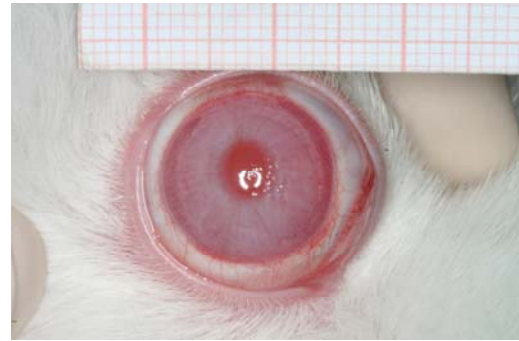


(14)

Figuras 15 e 16 -Fotos mostrando a etiqueta de identificação (precedendo as fotos de cada olho) e olho do coelho 3, no dia zero, antes da queimadura da córnea.

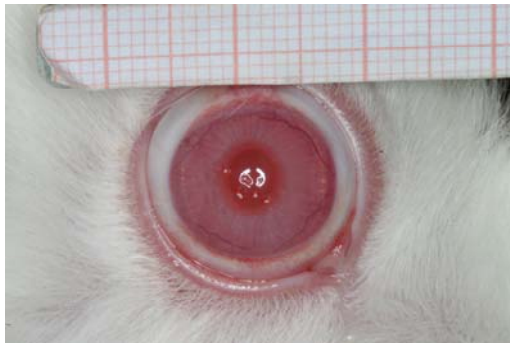


(15)

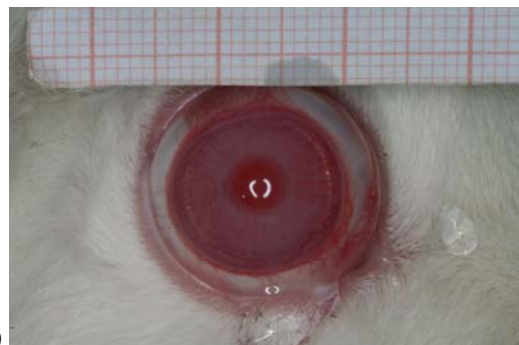


(16)

Figuras 17 e 18 -Fotos mostrando o olho dos coelhos 6 e 11, no dia zero, antes da queimadura da córnea.



(17)



(18)

Figura 19 - Fotos mostrando o olho do coelho 16, no dia zero, antes da queimadura da córnea.



(19)

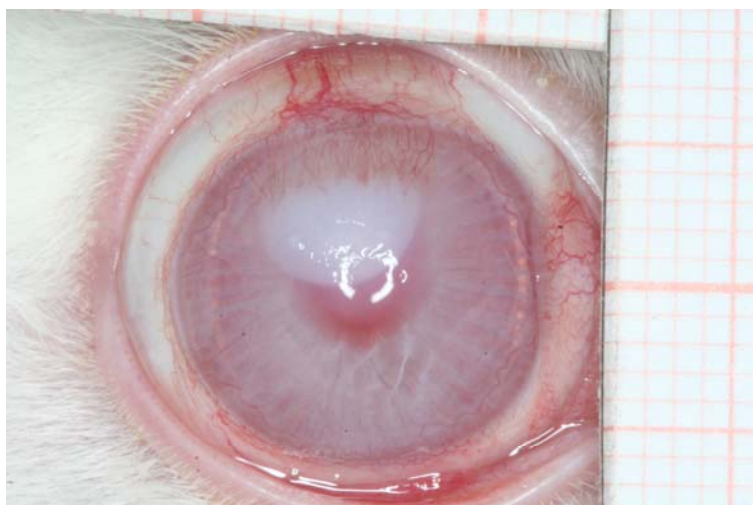
Figuras 20, 21 e 22 Fotos mostrando o olho do coelho 3 (injeção de SF) no dia zero, no quinto e décimo dia após a queimadura.



(20)

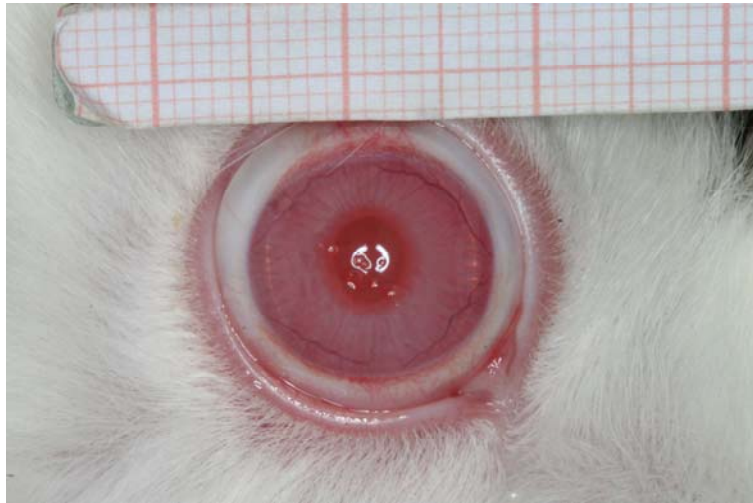


(21)



(22)

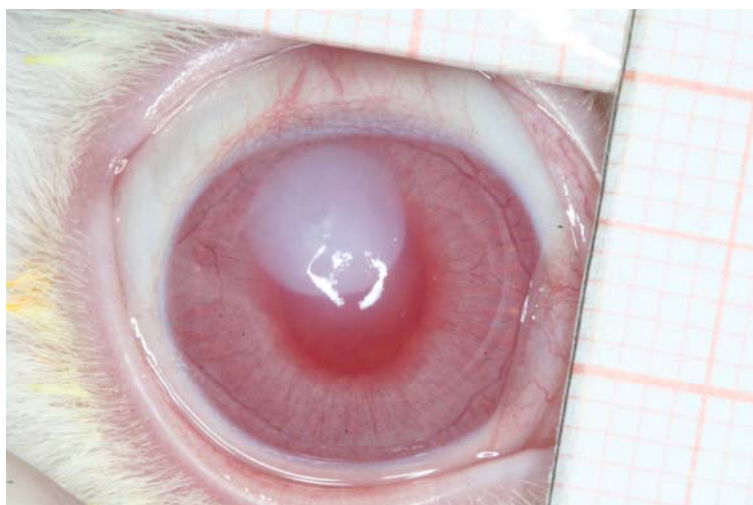
Figuras 23, 24 e 25 - Fotos mostrando o olho do coelho 6 (injeção de Avastin®) no dia zero, no quinto e décimo dia após a queimadura.



(23)

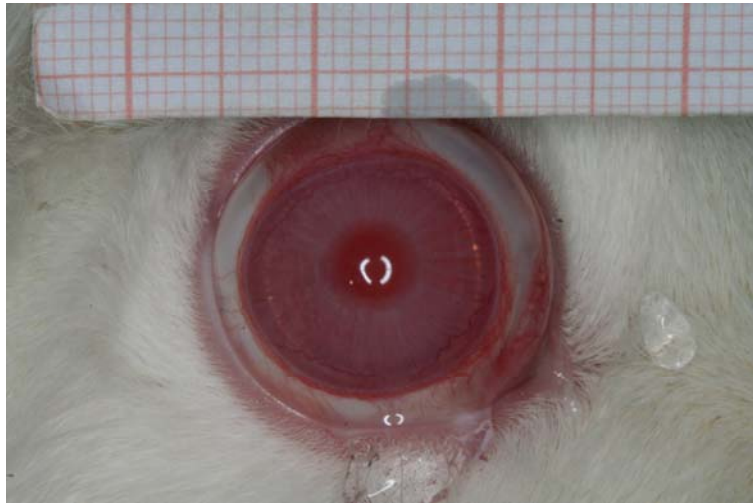


(24)

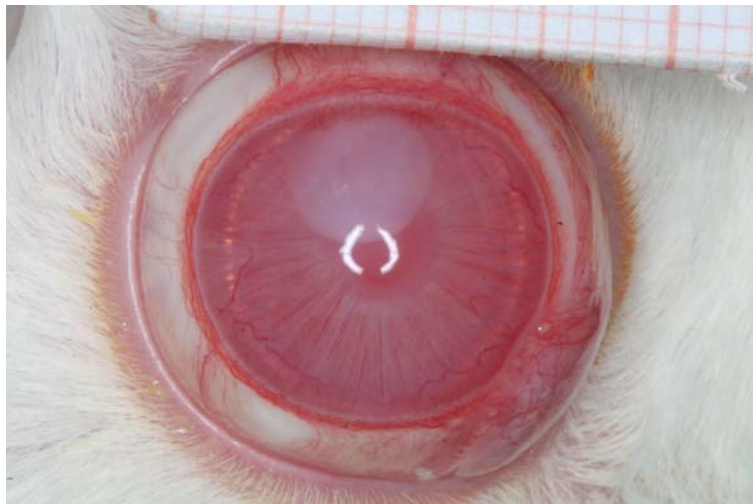


(25)

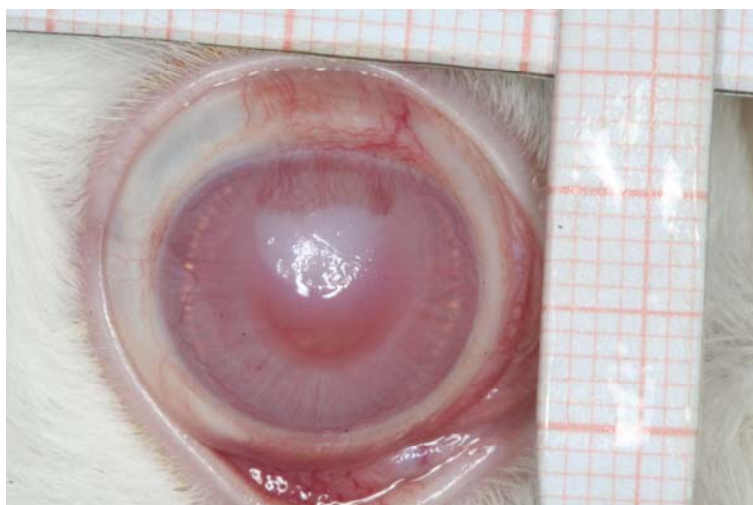
Figuras 26, 27 e 28 - Fotos mostrando o olho do coelho 11 (instilação de SF) no dia zero, no quinto e décimo dia após a queimadura.



(26)

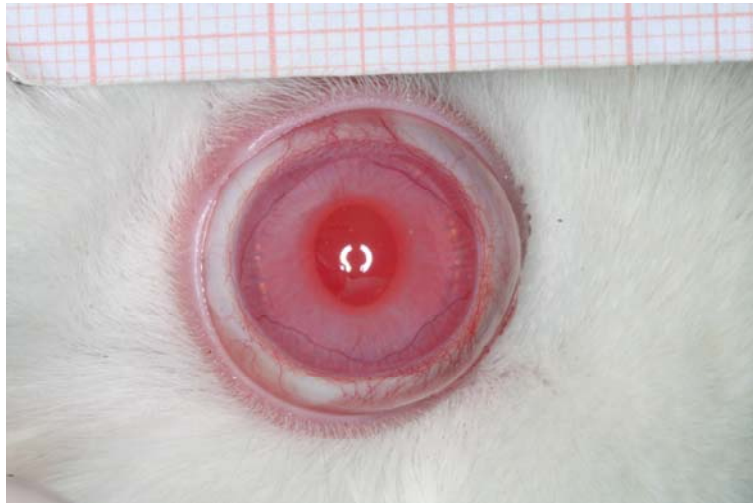


(27)



(28)

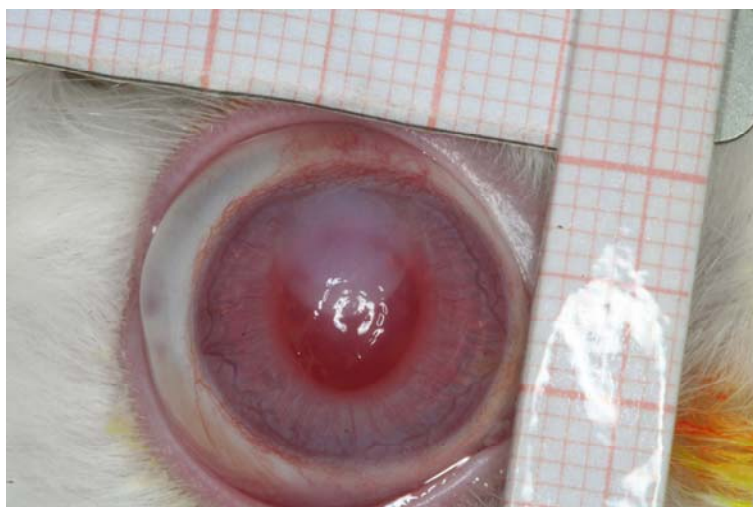
Figuras 29, 30 e 31 - Fotos mostrando o olho do coelho 16 (instilação de Avastin®) no dia zero, no quinto e décimo dia após a queimadura.



(29)



(30)



(31)

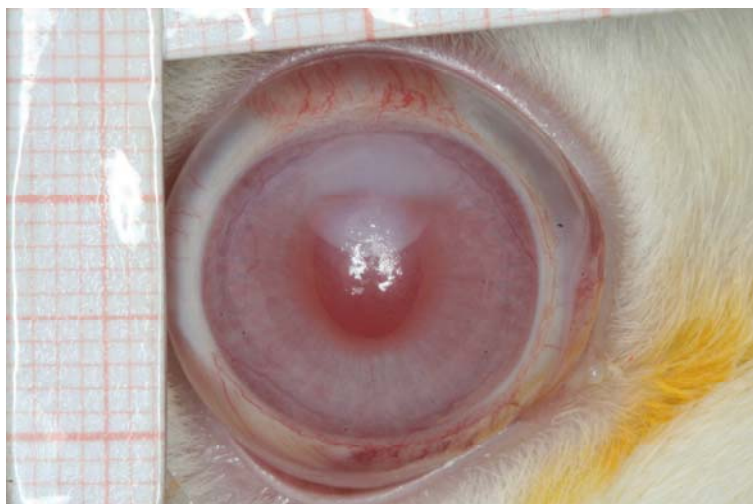
Figuras 32, 33 e 34- Fotos mostrando que não houve crescimento de neovasos no olho do coelho 20 (instilação de avastin®); fotos do dia zero, do quinto e do décimo dia, respectivamente.



(32)

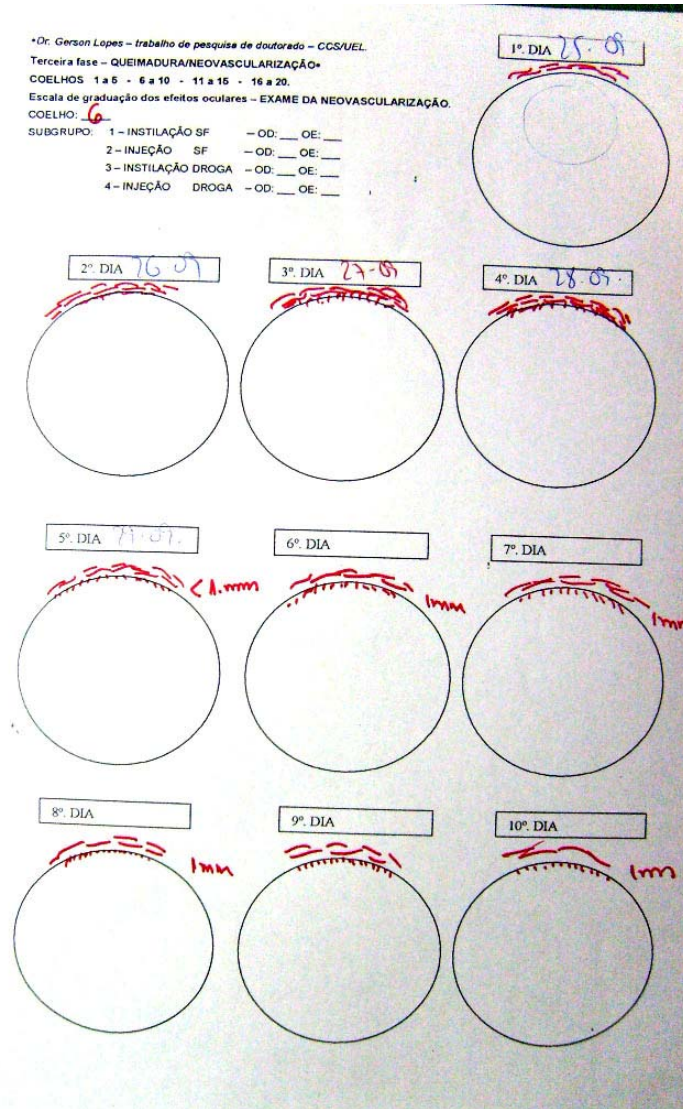


(33)



(34)

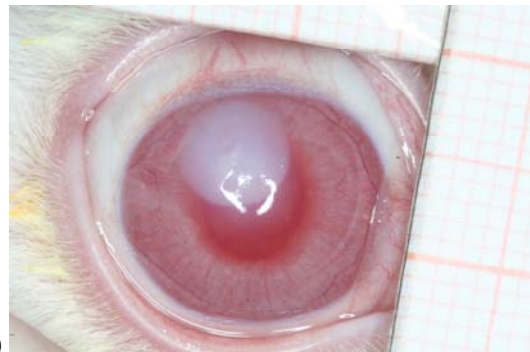
Figuras 35, 36 e 37 - Foto ilustrativa do esquema de desenho da neovascularização do coelho 6 realizada pelo examinador e foto do olho do coelho 6 no quinto e décimo dia após a queimadura.



(35)

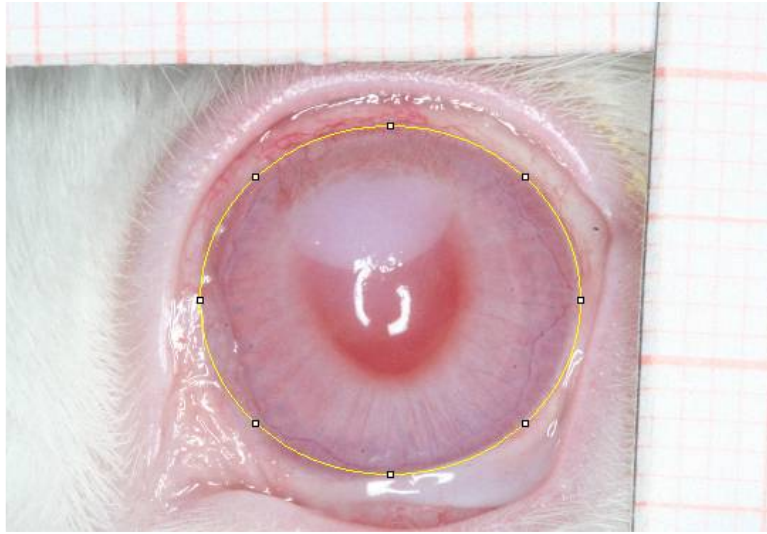


(36)

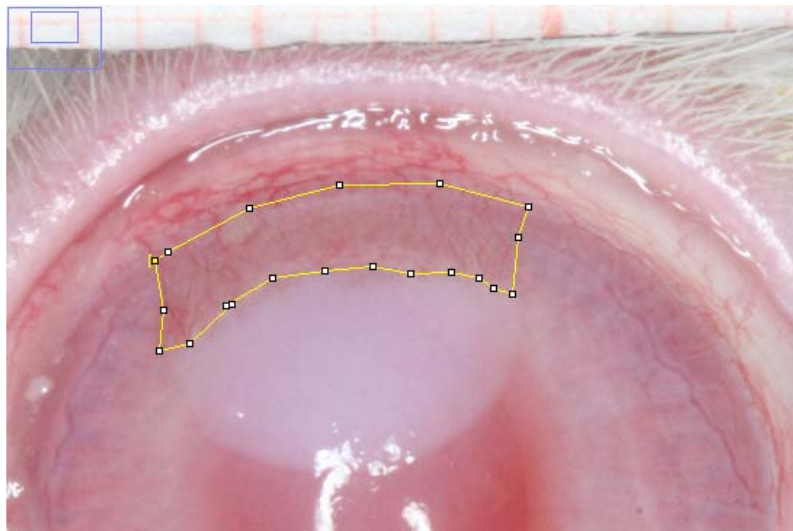


(37)

Figuras 38 e 39 -Fotos mostrando as marcações realizadas no programa de computador para cálculo da área de neovascularização.

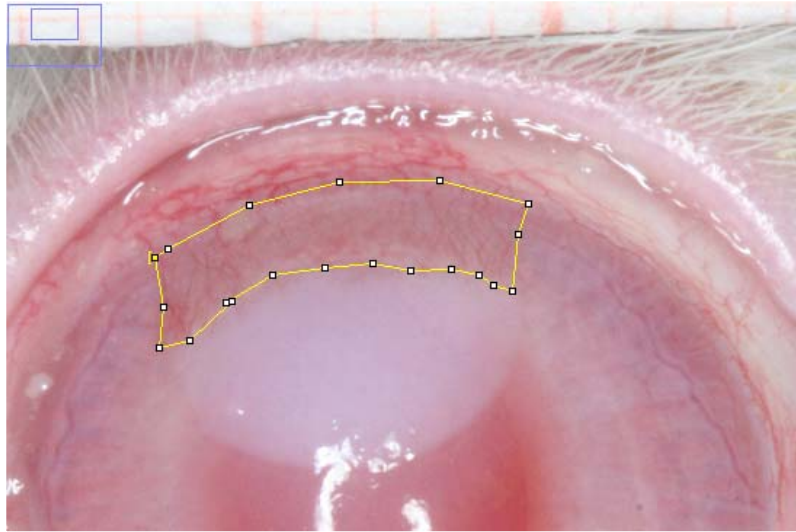


(38)

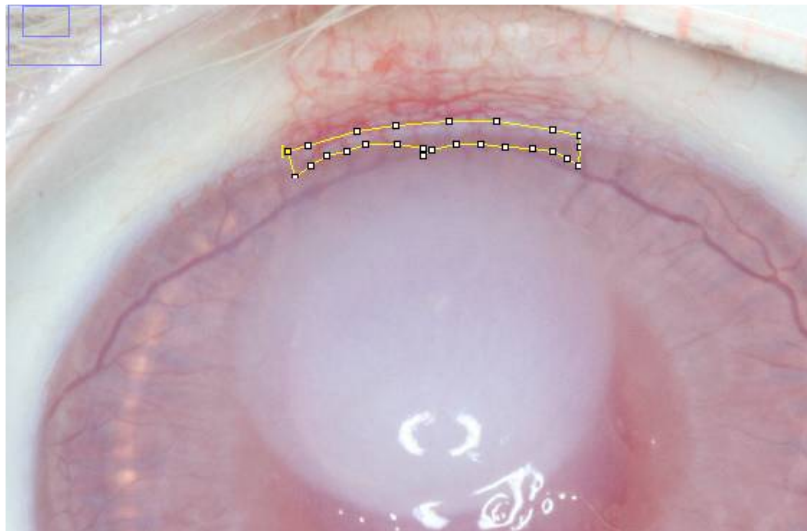


(39)

Figuras 40 e 41 -Fotos da área de neovasos formados, mostrando a comparação entre dois olhos de grupos diferentes (respectivamente, coelho 1/injeção de SF e coelho 8/injeção de Avastin®).



(40)



(41)