



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA MIYAGUSKO TABA OGUIDO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA NARINGENINA NA INIBIÇÃO DA
NEOVASCULARIZAÇÃO INDUZIDA POR ÁLCALI EM OLHOS DE
CAMUNDONGOS**

ANA PAULA MIYAGUSKO TABA OGUIDO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA NARINGENINA NA INIBIÇÃO DA
NEOVASCULARIZAÇÃO INDUZIDA POR ÁLCALI EM OLHOS DE
CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Marcelo Barbante
Casella

Coorientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri
Junior

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O35a Oguido, Ana Paula Miyagusko Taba.

Avaliação do efeito da naringenina na inibição da neovascularização induzida por álcali em olhos de camundongos / Ana Paula Miyagusko Taba Oguido. – Londrina, 2014.

98 f. il.

Orientador: Antônio Marcelo Barbante Casella.

Coorientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Córnea – Doenças – Teses. 2. Neovascularização – Teses. 3. Flavonóides – Teses. 4. Agentes antiinflamatórios – Teses. 5. Camundongo como animal de laboratório – Teses. I. Casella, Antônio Marcelo Barbante. II. Verri Junior, Waldiceu Aparecido. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 617.7

ANA PAULA MIYAGUSKO TABA OGUIDO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA NARINGENINA NA INIBIÇÃO DA
NEOVASCULARIZAÇÃO INDUZIDA POR ÁLCALI EM OLHOS DE CAMUNDONGOS**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcelo Barbante
Casella
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gerson Jorge Aparecido Lopes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rui Barroso Schimiti
Clínica de Olhos Dr. Rui Schimiti

Profa Dra. Sandra Regina Georgetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 Agosto 2014.

`A Deus sempre presente em todas as coisas...

`A minha irmã Maria Rita, exemplo de força e coragem.

*Ao César, Beatriz e Ana Carolina, pessoas mais importantes da minha vida, pelo apoio em
todas as horas...*

"Se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros dos gigantes"

Isaac Newton

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus orientadores

Prof. Dr. Antonio Marcelo Barbante Casella, pelo apoio sempre presente, seu exemplo de dedicação e orientação cuidadosa.

Prof Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior, pela confiança depositada em mim e coorientação fundamental.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa, coordenador do programa de pós-graduação, de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, pela sua dedicação e importante trabalho na Coordenadoria de Pesquisa e Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. Waldir Garcia (*in memorian*) pelos enriquecedores ensinamentos e apoio na minha carreira acadêmica e elaboração desse projeto de pesquisa.

Ao apoio dos doutorandos Miriam Sayuri Nagashima Hohmann e Felipe A. Pinho-Ribeiro, pela colaboração essencial nas análises laboratoriais e na revisão do trabalho.

Ao Dr. Jefferson Crespigio na análise histopatológica e de imunohistoquímica.

À Prof.^a Dra. Tânia Longo Mazzuco, pela dedicação, apoio durante o curso de doutorado.

À Prof.^a Dra. Solange Paccola e Francis José pela colaboração da análise digital.

À equipe do laboratório de pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) e à Dra. Maria Emília sempre no apoio das atividades do laboratório de pós-graduação.

Aos meus alunos do curso residência de oftalmologia Ian Moreira e Alberto H. Utida pelo apoio nos cuidados e procedimentos com animais no Biotério do CCS.

Ao Dr. Donizeti Rodrigues Belitardo, médico veterinário do CCS, e equipe de cuidadores, Izaltino e José, junto ao biotério da pós-graduação.

Sílvia Shiwa, Georg Casari e Rita Casari, Mario Taba Junior e Valeria Taba pelo incentivo constante e pelas sugestões valiosas na redação do texto deste trabalho.

À Natali Silvana Zwaretch, pelo trabalho da formatação e normatização da minha tese.

Aos meus pais Yoneco e Mario Taba, pelos incentivos em todas as fases de minha vida, exemplos de persistência na conquista dos sonhos...

OGUIDO, Ana Paula Miyagusko Taba. **Avaliação do efeito da naringenina na inibição da neovascularização induzida por álcali em olhos de camundongos**. 2014. 98f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A Naringenina, (4', 5, 7- trihidroxiflavanona) é encontrada de forma abundante nas frutas cítricas, como "*grapefruit*", limão e laranja; é uma flavanona, classe de flavonóide considerada como um agente antioxidante, anti-inflamatória e antiangiogênica com papel na prevenção doenças neurodegenerativas, arteriosclerose, na geração de tumores e infecções. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a inibição da neovascularização corneana pela naringenina e seu mecanismo de ação através da monitoração da atividade de mieloperoxidase (MPO), n-acetil- β -D glucosaminidase (NAG), dos níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-10, da atividade antioxidante através dos ensaios da redução de poder de redução férrico (FRAP), e da capacidade antioxidante total do radical ácido 2,2'-Azinobis-(3-Etilbenzotiazolina 6-Sulfônico) (ABTS), dos níveis de antioxidantes, a glutaciona (GSH) e proteína sulfidril (PSH). Os animais foram divididos em grupos controle negativo sem estímulo neovascular (NaOH 1N), grupo controle positivo com estímulo neovascular tratado com solução fisiológica, grupo teste com estímulo neovascular tratado com suspensão de naringenina tópica em diferentes concentrações (subgrupos 0,08, 0,8, 8 e 80 μ g) aplicada duas vezes ao dia por 7 dias, iniciando 3 dias antes do estímulo com NaOH e grupo apenas com naringenina(80 μ g) sem estímulo neovascular. A naringenina reduziu o recrutamento de neutrófilos e macrófagos de forma dose dependente, sendo mais efetiva na maior concentração e reduziu de forma significativa ($p < 0.01$) a área de neovascularização. A naringenina (80 μ g) inibiu a expressão de IL-1 β , IL-6, de forma significativa ($p < 0.05$) nas análises realizadas 2, 4 e 6 horas após o estímulo com NaOH. Em relação a IL-10 houve uma tendência de aumento. Além disso, a naringenina inibiu a depleção da capacidade total antioxidante em 4 e 6 horas, e inibiu a depleção de GSH e PSH, de forma significativas nas medidas realizadas em 2, 4 e 6 horas. A naringenina demonstrou potencial inibitório da neovascularização corneana através dos mecanismos anti-inflamatório e antioxidante. O uso de colírio tópico de naringenina pode ser considerado um promissor adjuvante na modulação da resposta inflamatória e neovascularização corneana.

Palavras-chaves: Neovascularização corneana. Angiogênese. Córnea. Flavonóides. Modelo animal.

OGUIDO, Ana Paula Miyagusko Taba. **The inhibiting effect of Naringenin on alkali induced corneal neovascularization in mice**. 2014. 98p. Thesis (Doctorate in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

ABSTRACT

Naringenin (4', 5, 7- trihydroxyflavavone), abundantly found in citric fruits, such as limes, oranges, and grapefruits, is a flavanone, a flavonoid class. It is considered an antioxidant, anti-inflammatory, and angiogenesis inhibitor with roles in preventing neurodegenerative diseases, arteriosclerosis, and creation of tumors and infections. Thus, the goal of this work was to evaluate the inhibition of corneal neovascularization by naringenin and its mechanism of action through monitoring the activity of myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG); the levels of IL-1 β , IL-6, and IL-10; the antioxidant effect on the Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP); the acid 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS); and the levels of antioxidants, glutathione (GSH), and Protein Sulfhydryl (PSH). The animals were divided into a negative control group without neovascular stimulus (NaOH 1N); a positive control group with neovascular stimulus treated with a physiological solution; a test group with neovascular stimulus treated with a topic naringenin suspension in different concentrations (subgroups of 0.08, 0.8, 8, and 80 μ g) applied twice a day over a seven-day period, which began three days before the NaOH stimulus; and a group with naringenin (80 μ g) without neovascular stimulus. Dose-dependent naringenin reduced the neutrophils and macrophages recruitment, being most effective in a major concentration, and it reduced in significant form ($p < 0.01$) the area of neovascularization. Naringenin (80 μ g) inhibited the expression of IL-1 β and IL-6 in significant form ($p < 0.05$) in analyses performed two, four, and six hours after the NaOH stimulus. In regards to IL-10, there was a tendency of it increasing. Furthermore, naringenin inhibited the depletion of the total antioxidant capacity in analyses after four and six hours. It also inhibited the depletion of GSH and PSH in significant form in analyses performed in two, four, and six hours afterwards. Naringenin has demonstrated inhibitor potential on corneal neovascularization through its anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. Its eye drop use could be considered a promising adjuvant in the modulation of inflammatory response and corneal neovascularization.

Keywords: Corneal Neovascularization. Angiogenesis. Cornea. Flavonoids. Animal model .

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
BSA	Albumina bovina sérica
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CXC8/IL-8	Interleucina 8
CXCL1	Quimiocina L1
DAB	3,3-diaminobenzidina tetra-hidroclorido
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiâmino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ELISA	Teste imunoenzimático (<i>enzyme-linked-immunosorbent serologic assay</i>)
FGF	Fator de Crescimento de fibroblastos
FRAP	Poder antioxidante redutor do ferro
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona forma oxidada
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HE	Hematoxilina-eosina
HRP avidina	Avidina conjugada com peroxidase.
HTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzida
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio Dibásico Anidro
LOX	Lipoxigenase
MDA	Malonaldeído
mMol	Milimolar
MMs	meteloproteinases
MPC-1	Proteína quimioatrativa de monócitos
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
N	Normal

NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato
NAG	N-acetil- β -D glucosaminidase
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NF-kB	Fator de Transcrição Nuclear-Kappa B
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
NV	Neovascularização
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PPAR γ	Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais Gama
NLRP3	Receptores tipo NOD (sensores intracelulares)
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
SIL-6R	Receptor solúvel IL-6R
SPH	Grupo de proteínas sulfidrilas
TBARS	Substâncias reativas a ácido tiobarbitúrico
TGF	Fator de transformação do Crescimento
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tris-HCl	Tampão tris (hidroximetil) aminometano
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	DESENVOLVIMENTO	16
2.1	ANATOMIA DA CÓRNEA	16
2.2	MEDIADORES DA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA	17
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO	23
2.4	O MODELO DE ESTÍMULO DA NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEANA	26
2.5	TERAPIA ANTI ANGIOGÊNICA NA NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEANA	27
2.6	FLAVONÓIDES	28
3	OBJETIVO	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	33
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	33
4.2.1	Naringenina	33
4.2.2	Determinação de Infiltração de Leucócitos na Córnea	34
4.2.2.1	Determinação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO)	35
4.2.2.2	Determinação de atividade de N-Acetil B-D glucosaminidase (NAG)	35
4.2.3	Identificação da Neovascularização Corneana Através da Avaliação Clínica Fotográfica Digital Através Biomicroscópio	37
4.2.4	Avaliação da Produção de Citocinas	38
4.2.5	Avaliação do estresse oxidativo	39
4.2.5.1	Avaliação da Capacidade Antioxidante Total da córnea pelos ensaios de ABTS e FRAP	39
4.2.5.2	Quantificação da Glutathiona Reduzida (GSH) e Grupos Sulfidrilas Totais (PSH)	40

5	ANALISE ESTATÍSTICA.....	41
	REFERÊNCIA.....	42
6	ARTIGO - Naringenin eye drops inhibits NaOH induced corneal neovascularization and eye inflammation and oxidative stress in mice.....	59
8	CONCLUSÕES	79
	ANEXOS	80
	ANEXO A	81
	ANEXO B	82

1 INTRODUÇÃO

A neovascularização (NV) corresponde a formação de novos vasos a partir de um vaso preexistente (FOLKMAN, 1971). A formação descontrolada desses neovasos foi relacionada com vários mecanismos das desordens nos tecidos oculares (córnea, tecido uveal, retina e coróide), nas lesões tumorais e nas metástases, nos processos isquêmicos, inflamatórios e imunológicos (CARMELIET, 2005).

No olho, a NV é considerada responsável pelo mecanismo patológico das mais importantes e frequentes doenças que causam cegueira no adulto, a Degeneração Macular Relacionada à Idade e a Retinopatia Diabética Proliferativa, além da Retinopatia da Prematuridade, a maior causa de cegueira em crianças prematuras (CARMELIET, 2005; DACE et al., 2008; QAZI; MADDULA; AMBATI, 2009).

A córnea é um tecido ocular com propriedades importantes como a sua transparência e a ausência de vasos (BICAS, 1997; CHANG et al., 2001; CURSIEFEN; KUCHLE; NAUMANN, 1998; IMANISHI et al., 2000). A presença dos neovasos corneanos desencadeiam alterações em sua estrutura, e provocam a perda de sua transparência (BEEBE, 2008). Dados da NV corneana na literatura, demonstraram uma incidência de 1,4 milhões ao ano nos Estados Unidos, e 12% desses casos são responsáveis pela cegueira (LEE; WANG; ADAMIS, 1998). A NV na córnea foi considerada a segunda causa de cegueira e baixa acuidade visual por Whitcher, Srinivasan e Madan (2001). Dentre as causas de injúrias oculares, 11,5% a 22,1 % foram decorrentes de queimaduras químicas, responsáveis por induzir a NV corneanas (ORMEROD; ABELSON; KENYON, 1989), principalmente em jovens e trabalhadores do sexo masculino (CLARE et al., 2012).

A córnea representa um tecido privilegiado em relação à resposta imunológica nos transplantes, devido a sua propriedade avascular. A taxa de sucesso dos transplantes corresponde em torno de 90% (AZAR, 2006; KUCHLE et al., 2002; NIEDERKORN, 2013; STREILEIN et al., 1999). Porém a ocorrência da NV representa um dos principais fatores de risco para a rejeição nesses pacientes submetidos à transplantes de córnea (DANA; STREILEIN, 1996; MAGUIRE et al., 1994; CURSIEFEN et al., 2003). Esse risco de rejeição imunológica (insucesso) se eleva para índices em torno de 50%, segundo dados dos estudos clínicos e experimentais descritos por Dana e Streilein (1996).

A NV fisiológica está normalmente presente no processo de cicatrização do tecido e na proliferação endometrial no ciclo ovariano (FOLKMAN; SHING, 1992). Nos danos teciduais, a formação dos neovasos representa uma fase importante que permite a troca e nutrição entre as células metabolicamente ativas nas áreas lesadas (COHEN, 2006). Sob o estímulo de vários

mediadores, as células endoteliais presentes no interior de capilares periféricos das lesões, passam pelo processo de diferenciação e iniciam a capacidade de formação de novos tubos capilares e formação de neovasos (FOLKMAN; SHING 1992).

Apesar da NV representar um mecanismo de resposta fisiológica e uma forma de reparo do tecido à estímulos locais, como os traumas mecânicos, químicos ou infecções, a manutenção da qualidade do tecido corneano depende de um equilíbrio no sistema de controle angiogênicos (CHANG et al., 2001). A NV patológica corresponde à alteração do equilíbrio de fatores reguladores, tais como na Retinopatia diabética proliferativa, no qual o maior estímulo de fatores angiogênicos levam os vasos retinianos a invadirem o vítreo (TANG et al., 2013); e na Degeneração macular relacionada à idade (forma neovascular), os neovasos coroidianos invadem as estruturas retinianas, através da membrana de Bruch, epitélio pigmentado da retina e fotorreceptores da região macular, resultando na perda da acuidade visual (AMBATI; FOWLER, 2012; VAN LOOKEREN CAMPAGNE et al., 2014).

A lesão produzida por uma substância alcalina em contato com a córnea leva a danos oculares, desde o epitélio corneano até as suas estruturas intraoculares, com rápida resposta inflamatória, isquemia de vasos limbares e de segmento anterior, podendo evoluir para a NV (WAGONER, 1997).

Os vários reguladores moleculares da inflamação, da isquemia e do estresse oxidativo, envolvidos na injúria tecidual comandam a liberação de fatores capazes de induzir o início de uma cascata de eventos que contribuem para a angiogênese (AZAR, 2006; FERRARA; KERBEL, 2005; KIM; CHUNG, 2013). O conhecimento desses mecanismos e dos fatores envolvidos possibilita uma ação específica, com agentes que atuem em cada etapa da angiogênese.

Desde o início da terapia com anticorpos para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) há uma década, considerado um marco na terapia contra o câncer, outras formas de tratamento moleculares vem sendo descobertas desde então, com alvo na sinalização da família do VEGF (DUDA, 2012). O benefício dessas novas terapias atingem mais de 500 milhões de pessoas (CARMELIET, 2005). Porém, para algumas doenças, a terapia padrão com os anti-VEGF apresentou certa resistência e ineficácia no combate a NV ou na sua progressão (CARMELIET; JAIN, 2011; DUDA, 2012).

Apesar de existirem opções terapêuticas disponíveis para a NV corneana, como o uso de corticosteróides tópicos e anti-inflamatórios não esteroidais (CHANG et al., 2001), esses são limitados devido a pouca eficácia e efeitos colaterais como catarata, hipertensão ocular e perda da visão (COLE et al., 2007).

As novas terapias moleculares com os anticorpos monoclonais como bevacizumab (Avastin®, Roche, Brasil) (KIM et al., 2014 FERRARI et al., 2013); ranibizumab (Lucentis®, Novartis,

Suiça), pegaptanib (Macugen®, Pfizer, USA)(STEVENSON et al., 2012; DURSON et al., 2012) e aflibercept (Eylea®, Regeneron, USA) (CHANG et al., 2012) são consideradas promissoras, mas ainda de uso experimental na NV corneana.

Dentre as novas terapias, o estudo em fase mais avançada de comprovação da eficácia e segurança, se encontra na fase III de estudos clínicos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (CURSIEFEN et al., 2014). Apesar do complexo mecanismo molecular e os fatores envolvidos na NV estarem sendo vastamente estudados e esclarecidos nesses últimos anos (CHANG et al., 2012; QAZI; KEELEY; MEHRAD; STRIETER, 2008; MADDULA; AMBATI, 2009; SIVAK et al., 2011), até o momento não existe um tratamento totalmente eficaz para essa patologia (PAPATHANASSIOU et al., 2013; MOHAMMADPOUR, 2013).

Os flavonóides são considerados antioxidantes naturais, encontrados nos alimentos, e sua ação se deve pela presença do grupo fenólico hidroxil ligado ao anel fenólico da sua estrutura. Os flavonóides podem agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio, varredor de radical superóxido, quelante de íons metálicos, além de ativarem enzimas antioxidantes e inibirem as oxidases (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

A naringenina, uma flavanona da classe dos flavonóides, encontrada em sua maior concentração nas frutas cítricas (COELHO et al., 2013), tem sido reportada por sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, neuroprotetora, anticancerígena e antiangiogênica (PELUSO; RAGUZZINI; SERAFINI, 2013; YILMA et al., 2013; CAVIA-SAIZ et al., 2010; COELHO et al., 2013; XU et al., 2014).

Pelas propriedades já descritas dos flavonóides, a naringenina foi considerada como uma provável opção terapêutica da NV corneana inflamatória induzida pela lesão decorrente de queimadura química, doença de grande morbidade e importante causa de baixa acuidade visual.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 ANATOMIA DA CÓRNEA

A córnea é um tecido transparente, avascular e de forma esférica, que reveste a parte externa do globo ocular, juntamente com a esclera. A córnea apresenta propriedades especiais, além da proteção contra agentes externos, é responsável por 74% do poder refracional do olho. As medidas horizontais variam de 11 a 12 mm, verticalmente de 9 a 11 mm, e sua espessura média é de 550 micra. A sua estrutura microscópica é relativamente simples, comparada com outras partes do corpo, apresentam 3 camadas celulares: epitélio, estroma e endotélio; as interfaces acelulares: camada de Bowman e membrana de Descemet (KRACHMER; MANNIS; HOLLAN, 2005), e a recentemente descrita, camada pré Descemet de Dua (DUA et al., 2013).

O epitélio consiste em 5 a 6 camadas de células não queratinizada, escamosas e estratificadas, com 50 micra de espessura. As células das camadas superficiais são as mais diferenciadas e com pouca atividade metabólica, diferentemente das células basais. A membrana das células epiteliais são compostas por glicoproteínas e glicolípídeos embebidos na hidrofóbica camada lipídica. Nas camadas superficiais apresentam partículas especiais denominadas glicocálices, que conferem a propriedade hidrofílica das células superficiais.

O estroma é o maior componente (90%) da córnea, composto por fibras colágenas (tipo I, III, IV e VII) uniformemente dispostas, e dessa forma, essencial para a transparência corneana. É composto ainda pela matriz extracelular, colágeno, glicosaminoglicanos e ceratócitos (fibroblastos corneanos), que correspondem a 3% do volume estromal. Tanto o epitélio como o endotélio são responsáveis para o estado de hidratação ideal da córnea.

O endotélio é composto por monocamada de células hexagonais, responsáveis pela regulação da hidratação corneana. Essas células apresentam grande atividade metabólica, devido à presença de transporte ativo de íons, para o controle da entrada de água no estroma. No adulto apresentam um número em torno de 3000 células/mm², e raramente se regeneram.

A camada de Bowman (entre epitélio e estroma), membrana de Dua (pré Descemet) e de membrana de Descemet (membrana basal das células do endotélio), são interfaces acelulares, compostas de fibras de colágeno, principalmente as do tipo IV.

A córnea de camundongo, de forma semelhante com a dos primatas, apresentam as três camadas celulares: epitélio, estroma e endotélio, e as interfaces acelulares, compostas de fibras de colágenos. A córnea de camundongos foi considerada um modelo apropriado para as pesquisas experimentais, apesar de apresentarem diferenças com a córnea humana ou de primatas, como

maior proporção da camada epitelial (30%), e maior espessura central do que periférica (HENRIKSSON; BRON; BERGMANSON, 2012). Contudo, os roedores apresentam vantagens como a facilidade no manuseio (alimentação, higiene e acomodação); ciclo biológico curto (aproximadamente 2 anos), possibilitando o trabalho simultâneo com vários grupos experimentais e custo financeiro acessível.

A córnea é um tecido externo no globo ocular e naturalmente avascular, portanto privilegiado do ponto de vista imunológico. Por essas propriedades, o estudo no tecido corneano permite o estímulo neovascular e sua análise (o surgimento de um vaso é consequência do estímulo utilizado), além da observação direta, acompanhamento temporal e espacial do processo angiogênico (FECHINE-JAMACARU; FECHINE JÚNIOR; MORAES FILHO, 2005).

O modelo de NV corneana foi amplamente utilizado por Folkman e colaboradores nos estudos do mecanismo da angiogênese, e considerado um marco no esclarecimento desses mecanismos e atividade dos mediadores envolvidos nesse processo (FOLKMAN, 1971; LI et al., 1991; KENYON et al., 1996; REGENFUSS et al., 2008).

Os métodos utilizados para o estímulo vascular podem ser aqueles através de dispositivos ou implantes intracorneanos carregados com diversos agentes, como os fatores de estímulo do crescimento vascular, ou indiretamente através de toxinas ou estímulos inflamatórios (LI et al., 1991). Outra técnica utilizada como modelo de indução angiogênica é a desencadeada pela inflamação na córnea, por trauma mecânico, térmico ou uma cauterização química (nitrato de prata, fios de sutura, hidróxido de sódio) (FECHINE-JAMACARU; FECHINE JÚNIOR; MORAES FILHO, 2005; LOPES, 2008), induzida a partir da vasculatura limbar, através de um estímulo neovascular indireto (SUNDERKÖTTER et al., 1991).

O modelo experimental utilizado neste estudo, foi a indução da neovascularização corneana por injúria através do álcali NaOH, 1N. Escolhido por ser muito utilizado, facilidade de reprodutividade e simplicidade. Esse modelo simula uma das principais causas de acidente oculares (queimadura oculares por álcali), em jovens trabalhadores, com devastadora morbidade, pela NV corneana e baixa acuidade visual (CLARE et al., 2012).

2.2 MEDIADORES DA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA

O início da NV foi demonstrado estar relacionado com um processo inflamatório, através do envolvimento de células e mediadores inflamatórios, apenas modificados de acordo com o local e sua forma de apresentação, podendo ser fisiológica ou patológica (CHANG et al., 2001; EPSTEIN et al., 1987; KEELEY; MEHRAD; STRIETER, 2008).

A inflamação pode ser dividida em duas etapas, aguda e crônica, baseada na duração o

e suas características patológicas. A resposta inflamatória aguda, desencadeada por injúrias locais, biológicas, químicas ou físicas, apresenta como principais características a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e a infiltração celular (parte da resposta imune inata). Nesta fase ocorre a exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e o recrutamento de leucócitos, predominantemente neutrófilos, de forma direcionada para os locais alvo. A inflamação crônica está associada com a presença de linfócitos e macrófagos, NV, necrose tissular, e fibrose. Existem mecanismos anti-inflamatórios ativos que modulam a resposta e evitam que ela seja exacerbada (KUMAR et al., 2005).

Na presença de uma reação inflamatória aguda, os leucócitos são as primeiras células a se apresentarem e participarem na organizada inter-relação das células e dos mediadores da inflamação (LINGEN, 2001; NALDINI; CARRARO, 2005). Vários são os mediadores envolvidos na resposta inflamatória, tais como os derivados de precursores plasmáticos (calicreínas-cininas, sistema de coagulação, sistema complemento, plasmina, trombina), de células (neutrófilos, monócitos, linfócitos), substâncias pré-formadas da cascata da ativação (grânulos intracelulares como a histamina), da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico, derivados de ácido araquidônico (metabolizados tanto pela via das ciclooxigenases, as prostaglandinas ou pela via das lipoxigenases, os leucotrienos), além das citocinas (CRUVINEL et al., 2010).

No decorrer do processo inflamatório (fase crônica) são observadas tentativas de cicatrização pela substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo, através da angiogênese e pela fibrose tecidual (KUMAR et al., 2005).

O processo inflamatório e o complexo processo de angiogênese foram descritos como interconectados e envolvidos com a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs), onde novos vasos permitem o recrutamento contínuo de células inflamatórias, citocinas e quimiocinas, fatores de crescimento, mantendo o ciclo da angiogênese e estresse oxidativo (BITEMAN et al., 2007; GOSTNER et al., 2013; LIU et al., 2000; PILLAI et al., 2008; SAIKA et al., 2005), (GOSTNER et al., 2013; REUTER et al., 2010).

Na angiogênese, o estímulo pode ocorrer primeiramente pela via direta através dos fatores como o VEGF e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), ou pela via indireta, através de estímulo de fatores como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de transformação do crescimento (TGF) (COHEN et al., 1996; FOLKMAN, 1990), interleucinas e quimiocinas, como as derivadas dos neutrófilos e macrófagos (NOONAN et al., 2008).

No processo de formação de novos vasos, as células endoteliais dos vasos (principais células envolvidas na angiogênese), alinhadas as células sanguíneas, sofrem desestabilização da sua continuidade, que ocorre pela quebra da barreira da membrana basal do endotélio vascular. Esse mecanismo ocorre através de estímulos de fatores, enzimas e moléculas secretadas principalmente

pelos macrófagos ativados (AUERBACH, W.; AUERBACH, R., 1994; LINGEN, 2001). Entre esses fatores, se encontram o VEGF, TNF- α , interleucinas IL-1 (IL-1), interleucina IL-8 (IL-8), FGF e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) (NALDINI; PUCCI; CARRARO, 2001; OGAWA et al., 1999).

Uma vez que as células endoteliais alcançam o espaço extravascular, migram conforme a condução do estímulo quimiotático, estimulados pelos linfócitos ou macrófagos. A partir do processo de migração celular, as células endoteliais se proliferam em um número crescente a fim de promoverem a formação dos neovasos; subsequente a essa proliferação, em uma nova etapa do processo, as células endoteliais necessitam se reorganizar para a formação da estrutura tubular (FOLKMAN; INGBER, 1992; AUERBACH et al., 2003, NALDINI; CARRARO, 2005). Nesta etapa, novas células são recrutadas e regulam a remodelação tecidual, a resposta imune e a angiogênese. Dentre essas células incluem as plaquetas, neutrófilos, células T, células *natural killer* e macrófagos da circulação (NALDINI; PUCCI; CARRARO, 2001; NALDINI; CARRARO, 2005).

Nessa fase de proliferação celular endotelial alguns fatores pró-angiogênicos foram descritos como o FGF, TGF, Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e o VEGF. A ativação dos macrófagos, mastócitos e fibroblastos, é capaz de produzir grandes quantidades desses fatores pró-angiogênicos, incluindo ainda as citocinas inflamatórias. Essas últimas controlam a proliferação das células endoteliais, sua sobrevivência e apoptose, assim como a migração e ativação celular (LINGEN, 2001; NALDINI; CARRARO, 2005). Dentre os fatores pró-angiogênicos envolvidos, o VEGF é considerado o mais potente indutor da proliferação e migração celular, sendo responsável pela manutenção da sustentação neovascular (COHEN, 2002; FERRARA; KERBEL, 2005; SENER, 2010).

Os leucócitos e macrófagos contribuem também para a remodelação da matriz extracelular, atuando na liberação de enzimas como metaloproteinases (MMs), catepsinas, plasminogênicos e uroquinases (KUNDU; SURTH, 2012; RUEGG, 2006). Para a proliferação de células endoteliais em direção a um estímulo angiogênico, a matriz extracelular deve ser seletivamente degradada, principalmente pelas MMs, que continuam a mais importante família de enzimas no controle deste processo. Na córnea, as MMs degradam o colágeno tipo IV, presente na membrana basal, permitindo a separação do epitélio das camadas estromais, mediadas por moléculas de adesão, as integrinas (VU; WERB, 2000).

Os neutrófilos foram descritos como uma das mais importantes células na promoção da NV coroidal experimental (ZHOU et al., 2005), uma vez que são as células mais abundantes no sangue periférico e juntamente com macrófagos atuam ativamente como células apresentadoras de antígenos, potencializam as respostas de células como linfócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, interleucina IL-6 (IL-6), interleucina IL-12 (IL-12), IL-8 e TNF- α (CRUVINEL et al., 2010; DANA, 2007; DINARELLO, 2009).

Uma situação comum nos diversos locais do início da NV inflamatória foi o estado de

hipóxia tecidual prévio, seguido de um aumento da expressão dos fatores estimulantes da angiogênese (SCHAPER; SCHOLZ, 2003). A hipóxia presente no sítio inflamatório foi descrita como um importante estímulo pró-angiogênico, sinalizador dos fatores de ativação como do VEGF, do FGF e TNF- α (GRANGER; SENCHENKOVA, 2010).

As citocinas são as principais mediadoras do processo inflamatório, imunológico e angiogênico (MESQUITA et al., 2010; VARELLA; FORTE, 2001). Em um processo inflamatório, as citocinas sinalizam e transmitem informações através de receptores de membranas, tanto de células locais, na sua célula produtora ou célula distante sistêmica (CUNHA et al., 2005; VARELLA; FORTE, 2001). As principais células que as produzem são os leucócitos, macrófagos, fibroblastos em consequência de uma lesão tecidual (CUNHA et al., 2005; SAIKA, 2007; VARELLA; FORTE, 2001).

A IL-1 foi descrita como uma família composta por 11 citocinas, com dois compostos proteicos principais, IL-1 α e IL-1 β e seu receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) (DINARELLO, 1996, VORONOV et al., 2013, HUISING et al., 2004). A IL-1 é intensamente produzida e secretada por vários tipos de células ativadas como os macrófagos, monócitos, fibroblastos e célula detriticas, bem como linfócitos B, células *natural killer* e células epiteliais. Essas citocinas tem papel importante na resposta contra a infecção, além de aumentarem a expressão de fatores de adesão das células endoteliais (NALDINI; CARRARO, 2005; VORONOV; CARMI; APTE, 2014). Tanto IL-1 α como IL-1 β foram consideradas as primeiras citocinas envolvidas na cascata de mediadores do processo inflamatório, juntamente com o TNF- α , quimiocina L1 (CXCL1) e quimiocinas derivada de queratinócitos (AGGARWAL et al., 2012; NALDINI; CARRARO, 2005; VERRI et al., 2006).

A IL-1 β não se encontra presente em condições homeostáticas, mas foi demonstrado ser induzida e secretada somente na sinalização inflamatória, sendo seu precursor IL-1 β metabolicamente inativo até ser enzimaticamente ativado pela caspase-1 (DINARELLO, 2009). A sua expressão é induzida pelo fator de transcrição nuclear NF- κ B, após exposição das células imunes a alarminas, moléculas sinalizadoras de dano celular. A IL-1 β apresenta sensores citoplasmáticos de padrões moleculares associados aos patógenos ou a danos celulares, que uma vez ativados, funciona como um complexo capaz de recrutar pró-caspase-1 e promover a formação de inflamassomas, receptores do tipo NOD (NLRs), constituído por um complexo proteico que controla a sua produção e a maturação (NALDINI; CARRARO, 2005). Essa interleucina foi considerada a mais importante molécula inflamatória, por ser extensivamente secretada (VORONOV; CARMI; APTE, 2014).

As ações pró-inflamatórias de IL-1 β são semelhantes à ação do TNF- α , como a modulação da expressão de células endoteliais, diminuição da coagulação, atividade quimiotática no recrutamento de leucócitos e estímulo ao metabolismo oxidativo (AGGARWAL; GUPTA; KIM, 2003; DESCH et al., 1990; MACKAY et al., 1993; NALDINI; CARRARO, 2005; VARELLA et al., 2001;). Além disso, essas citocinas estimulam a produção de mediadores secundários como as quimiocinas,

ciclooxigenases, prostaglandinas e MMPs, sustentando a resposta inflamatória, sendo fundamentais para a angiogênese (VORONOV; CARMI; APTE, 2014). Em estudos prévios, a IL-1 β demonstrou promover a angiogênese e sua expressão foi elevada nos monócitos expostos às condições de hipóxia (NALDINI; CARRARO, 2005, VORONOV; CARMI; APTE, 2014; VORONOV et al., 2013; CARMI et al., 2009).

Wilson e Esposito (2009) reportaram que IL-1 β está presente no epitélio intacto das células epiteliais e são liberadas dentro do estroma corneano após uma injúria mecânica. Hong et al. (2001) demonstraram que a IL-1 β tem um papel importante na regulação da infiltração estéril de células inflamatórias no epitélio após a injúria mecânica em olhos de coelhos. Ebihara et al. (2011) demonstraram que a IL-1 β induziu a produção de IL-6 e seu receptor solúvel SIL-6R pelos fibroblastos da córnea.

A Interleucina IL-6 é considerada uma citocina pró-inflamatória, com seu receptor solúvel SIL-6R, regula a inflamação, a resposta imune e é produzida por diferentes tipos celulares como macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos (OKADA; MURAKAMI, 1998). Em algumas doenças oculares como Síndrome de Sjogren, conjuntivites secas, vernais e nas uveítes, a IL-6 apresentou-se em níveis elevados (SIMON et al., 2008; YOON et al., 2007). A IL-6 foi reportada estar envolvida na cicatrização cutânea (GALLUCCI et al., 2000; GALLUCCI et al., 2001) e da córnea, durante o estímulo da migração de células epiteliais (NISHIDA et al., 1992a; NISHIDA et al., 1992b; NAKAMURA; NISHIDA, 1999). Tanto a IL-1 β e IL-6 foram demonstradas estarem dramaticamente elevadas na reparação do epitélio durante os primeiros estágios da queimadura por álcali na córnea (SOTOZONO et al., 1997).

Cohen e colaboradores (1996) demonstraram a indução indireta da angiogênese, através da citocina IL-6 e do estímulo do VEGF mRNA. A expressão da IL-6 foi demonstrada acompanhar a vascularização em tecidos de reprodução, cicatrização, crescimento de tumores (MATEO; REICHNER; ALBINA, 1994; MOTRO et al., 1990), edema macular da retinopatia diabética (FUNATSU et al., 2003; SHIMIZU et al., 2002) e NV corneana (EBRAHEM et al., 2006).

A IL-10 é produzida por células imunológicas, principalmente os monócitos, macrófagos, e células T, além dos leucócitos. Esta interleucina regula diferentes funções das células imunológicas, através dos complexos receptores transmembrana IL-10R1 e IL-10R2; diminui a produção de mediadores inflamatórios dos monócitos e macrófagos, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8; e apresenta função inibitória, de indução de tolerância e sequestradora dos macrófagos (de WAAL MALEFYT et al., 1991; MOSSER; EDWARDS, 2008; SABAT et al., 2010). Além disso, a IL-10 inibe a apresentação de antígenos (ROERS et al., 2004; WOLK et al., 2002). Sabat et al. (2010) descreveram como especial relevância da IL-10, a prevenção e limitação da expressão exagerada da reação específica e inespecífica da resposta imune, além de ser considerada a mais importante citocina com

propriedades anti-inflamatórias, ao lado do TGF- β (SABAT et al., 2010).

Outros fatores importantes envolvidos na cicatrização tecidual foram descritos como o Fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), produzidos pelas plaquetas, macrófagos, células endoteliais e musculatura lisa (MORI et al., 2002). O PDGF juntamente com VEGF, foi demonstrado ter um papel importante no desenvolvimento da retinopatia proliferativa (CAMPOCHIARO; HACKETT; VINOES, 1996; CAMPOCHIARO, 2013; MORI et al., 2002).

Os eicosanóides são metabólitos oxigenados produzidos pelas células a partir dos ácidos graxos, e possuem a função de regular a inflamação e o funcionamento do sistema imune. O Fator ativador de plaquetas (PAF), considerado um mediador lipídico, faz parte da família dos eicosanóides, composta pelas prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e derivados dos ácidos graxos hidroxilados. O PAF foi demonstrado ser produzido após estimulação inflamatória, pelos mono citos, macro fagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e plaquetas (CAMUSSI; TETTA; BAGLIONI, 1990). Os substratos para a formação dos eicosanóides são o ácido araquidônico, o ácido dihomo-gama-linolênico e ácido eicosapentaenóico (KALISH et al., 2013), que frente a um estímulo angiogênico, são mobilizados da membrana das células imunes e sofrem a ação da enzima fosfolipase A2, através da vias das ciclooxigenases ou lipoxigenases.

Bazan e Ottino (2002) demonstraram a produção de eucosanóides na fração mitocondrial de células da córnea de coelhos, após 2 horas da injúria corneana criogênica, com um aumento de 100% de produtos da ciclooxigenase (COX) como as prostaglandinas.

O PAF tem sido encontrado no processo inflamatório na injúria corneana, bem como nos nervos terminais sensitivos danificados que exercem influência trófica nas células epiteliais da córnea (BAZAN; OTTINO, 2002). Esses autores ainda demonstraram que a estimulação do PAF dependente do NF- κ B, nos receptores de transmembranas (proteína G), na expressão dos genes da ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS).

O dano na integridade do tecido corneano tem um papel importante na produção de mediadores lipídicos como o PAF e metabólitos como a COX-2. A produção de outros metabólitos lipídicos como lipoxigenase (LOX) agem como mensageiros secundários dos fatores de crescimento epidérmicos durante o reparo tecidual (KENCHEGOWDA; BAZAN, 2010). Os produtos da COX foram também descritos como contribuintes para a NV na córnea (FUJISHIMA et al., 2005; KALISH et al., 2013; UEDA 1997). A expressão aumentada de COX-2 resultou na liberação de fator de crescimento angiogênico e foi adjuvante na estimulação de células tumorais em humanos (MASFERRER et al., 2000).

O fator angiogênico mais importante, estimulador de proliferação, migração de células endoteliais, formação de tubo vascular, e envolvidos na inflamação é o VEGF, primeiramente descrito por Ferrara, Poete e colaboradores em 1989 (FERRARA; HENZEL, 1989). O VEGF pode ser produzido

pelas plaquetas, monócitos ativados, células T, células do epitélio pigmentado da retina, astrócitos, e células da musculatura lisa (FERRARA, 1999).

As células endoteliais são dependentes do VEGF, tanto durante a fase do desenvolvimento, como nos processos de angiogênese fisiológicos no ovário e útero (FERRARA; GERBER; LEUCOTER, 2003; HOEBEN et al., 2004). O VEGF apresenta função importante na angiogênese patológica dos tumores, na artrite reumatóide, na coróide e retina. VEGF foi demonstrado apresentar função na linfangiogênese em camundongos (FERRARA; GERBER; LEUCOTER, 2003), no estímulo das células endoteliais, incluindo a proteólise e degradação da matriz extracelular, proliferação endotelial, migração e formação de tubos vasculares (CHANG et al., 2001; FERRARA; GERBER; LEUCOTER, 2003; KROLL; WALTERBERG, 1999).

O VEGF pertence a uma família de genes que inclui o fator de crescimento placentário (PIGF), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. Esses fatores ligam-se aos receptores VEGFR1 e/ou VEGFR2 (CHANG et al., 2001; FERRARA; GERBER; LEUCOTER, 2003).

Nas doenças oculares o VEGF foi descrito ser responsável pelo aumento da permeabilidade vascular na Retinopatia diabética não proliferativa e proliferativa, na proliferação neovascular na Degeneração relacionada a idade e na Retinopatia de prematuridade (WITMER et al., 2003). Na córnea houve aumento da sua expressão na NV induzida em córnea de ratos, ocorrendo a expressão máxima de mRNA para VEGF em 24 horas (EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999). E, além disso, considerado um fator crítico na cascata da angiogênese (AMANO et al., 1998; GUPTA; ILLINGWORTH, 2011).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas ocorre uma produção contínua de espécies reativas de oxigênio (EROs) acompanhada por sua inativação, através da ação de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. O estresse oxidativo ocorre com o desequilíbrio das EROs e as defesas antioxidantes, na qual essas defesas antioxidantes são insuficientes ou incapazes de remover os agentes oxidantes, e conseqüentemente ocorre o aumento da formação de EROs (HALLIWELL, 1993). A presença de EROs, considerada citotóxica, prejudicial para as moléculas biológicas e o equilíbrio homeostático celular, levam a alterações como a depleção de glutatona (GSH), a peroxidação lipídica, danos nas membranas celulares, quebra de filamentos de DNA, ativação de proteases, nucleases e proteína quinases. Portanto, para permitir a sobrevivência das células em ambiente aeróbico, essas EROs devem ser neutralizadas pelos sistemas de defesas antioxidantes (FENG et al., 2003).

Mecanismos de proteção para os danos causados por radicais livres oxidantes incluem os

sistemas enzimáticos antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase; assim como os antioxidantes naturais, as vitaminas A, C e E e outros antioxidantes exógenos como o tocoferol, ascorbato, carotenóides e flavonóides (BARBOSA et al., 2010; KABUTO et al., 2003; MATSUGO et al., 2000).

As EROs como o íon superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou o radical hidroxila (OH^\cdot), são produtos do metabolismo de oxigênio gerados principalmente pelas mitocôndrias, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Esse processo de formação desses radicais ocorre através de reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação principalmente dos íons ferro e de cobre, tanto no metabolismo fisiológico ou patológico celular (BARBOSA et al., 2010; KABUTO et al., 2003).

O NF- κ B é um dos reguladores centrais da sobrevivência celular, a transcrição de DNA, e consequente expressão de muitos genes responsáveis pela resposta imune, inflamatória, arteriosclerose e câncer (BOWIE; ONEILL, 2000). O NF- κ B é uma proteína complexa localizada no núcleo das células, um fator nuclear de transcrição induzível, o primeiro diretamente envolvido no estresse oxidativo (SCHRECK; RIEBER; BAEUERLE, 1991). Além disso, o NF- κ B é mediado por citocinas (como o TNF- α e a IL-1 e a IL-6), EROs, radiação ultra violeta e oxidação lipídica (GUZIK; HARRISON, 2006).

No olho, o NF- κ B foi relacionado com a atividade mediadora da NV coroidiana (YOSHIDA et al., 1998).

O endotélio vascular foi considerado um dos primeiros alvos das EROs no estresse oxidativo, presente nas condições inflamatórias, mediadas por fagócitos ativados (SHONO et al., 1996; SHWEIKI et al., 1992; VERCELLOTTI et al., 1991).

O estresse oxidativo foi demonstrado estar envolvido com o processo da inflamação e vem sendo comprovado como importante estímulo de VEGF, migração do endotélio celular, envolvendo o receptor VEGFR2, na sinalização dos componentes antioxidantes, nas repostas angiogênicas nos crescimento dos tumores (OSHIKAWA et al., 2012; SHONO et al., 1996; USHIO-FUKAI; NAKAMURA, 2008).

A disfunção de enzimas envolvidas na produção de EROs é fundamental para o mecanismo de estresse oxidativo. A nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, representa uma enzima com papel fundamental nas etapas de formação de EROs, e foi detectada primeiramente em neutrófilos, com capacidade de geração de superóxido de oxigênio e formação de NADPH reduzido (BAEHNER; GILMAN; KARNOVSKY, 1970).

Além da NADPH oxidase, a xantina oxidase, LOX e COX constituem fontes principais de formação de EROs do sistema de enzimas redox (sistema de troca de elétrons, nas reações de oxidação e redução) (SCHRAMM et al., 2012).

A atividade NADPH oxidase foi demonstrada ser regulada pelas citocinas (TNF- α , TNF- β , IL-1), fatores de crescimento (EGF, FGF- β , IGF-1, PDGF, TGF- β , VEGF) e hormônios (GUZIK; HARRISON, 2006; SCHRAMM et al., 2012). A atividade de NADPH oxidase foi encontrada nas células endoteliais, células dos músculos lisos e fibroblastos (KLENIEWSKA et al., 2012).

Na retina, a biodisponibilidade de NADPH foi demonstrada estar diminuída na patogênese da retinopatia diabética, que negativamente afeta o sistema de defesa da GSH. GSH é considerado o principal tampão de oxirredução intracelular e desempenha uma função essencial na proteção celular contra o dano oxidativo (MEHTA et al., 2006; POLAK et al., 1997). Na córnea o sistema de NADPH oxidase contribui para a formação de superóxido durante a inflamação (O'BRIEN et al., 2006).

A atividade da enzima GSH redutase, antioxidante que gera GSH (glutaciona reduzida) e sua forma oxidada GSSG, depende de NADPH. A GSH é um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, glutamato e cisteína, sendo esse último aminoácido portador do grupo sulfidril (-SH). O GSH atua na proteção contra o estresse oxidativo, através da sua ação como captadora de radicais livres e indiretamente como substrato da glutaciona peroxidases e glutaciona-s-transferase, além de ser um marcador da viabilidade celular e sua diminuição é indicativa de lesão oxidante. Normalmente a oxidação desses compostos protéicos portadores de grupos sulfidril a dissulfetos mistos é uma resposta primária ao estresse oxidativo (KABUTO et al., 2003). Na córnea, a GSH foi descrita como responsável por manter sua hidratação e transparência (GANEA; HARDING, 2006).

A depleção de NADPH também diminui a síntese de Óxido Nítrico (NO), um agente protetor vascular. O NADPH serve como um cofator para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (OMOLOLA; AYEPOLA; OGUNTI, 2014; VAÑEZ-VIVAR et al., 1998).

NO tem papel importante nos processos moleculares como a inibição de ativação de plaquetas, relaxamento vascular, e ação anti-inflamatória. Sua redução aumenta a inflamação e rompe a integridade de células endoteliais (MEHTA et al., 2006; OMOLOLA; AYEPOLA; OGUNTI, 2014, VAÑEZ-VIVAR et al., 1998). Por outro lado, o NO é considerado um fator pró-inflamatório, em situações anormais de elevada produção, e importante na formação de intermediários reativos do nitrogênio (RNS), na patogênese da inflamação vascular e disfunção endotelial (SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007).

Os macrófagos possuem atividade fagocítica intensa e possuem um sistema de digestão intracelular com envolvimento tanto de EROs, como RNS (CRUVINEL et al., 2010; THOMAS et al., 2008). NO foi relacionado com a angiogênese pelos efeitos mitogênicos estimulados por VEGF em células endoteliais microvasculares (COOKE; LOSORDO, 2002; MORBIDELLI et al., 1996; ZICHE et al., 1997) e pelo aumento da expressão de FGF (DULAK et al., 2000).

O mecanismo de peroxidação lipídica refere-se à degradação de lipídeos das membranas

celulares na presença de EROs, que leva a lesão dessas membranas, com a alteração na permeabilidade ao fluxo iônico, alterações do DNA, oxidação das lipoproteínas e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (BALASUBRAMANIYAN; KALAIVANI SAILAJA; NALINI, 2003). Os produtos finais são os reativos de aldeído, como a formação de malonaldeído (MDA), mensageiros secundários de EROs, considerados indicadores mais comuns da peroxidação lipídica (BARBOSA et al., 2010).

2.4 O MODELO DE ESTÍMULO DA NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEANA

A injúria química pelo NaOH na córnea estimula a formação dos novos vasos pelo mecanismo inflamatório, partir da vasculatura limbica. Trata-se, portanto, de um estímulo neovascular indireto e inespecífico (SUNDERKOTTER et al., 1991; KENYON et al., 1996). O modelo de queimadura por álcali na córnea em animais é amplamente utilizado nos estudos da NV inflamatória, incluindo os camundongos (KUBOTA et al., 2011; SAIKA et al., 2005)

A severidade da queimadura química corneana é dependente do ânion ou cátion, da sua concentração, seu volume, duração do contato e toxicidade inerente ao agente químico; podendo atingir e provocar danos as estruturas intraoculares. O NaOH em contato com a córnea provoca uma reação saponificação do ânion hidroxido (OH) com os ácidos gordurosos das membranas celulares, com resultante rotura e morte celular e o cátion é responsável pela penetração do álcali específico. Cátions reagem com os grupos carboxílicos do colágeno estromal e dos glicosaminoglicanos e a hidratação destes resulta em perda da transparência do estroma (WAGONER, 1997).

Clinicamente, a injúria por álcali pode originar dor severa pela estimulação de terminações nervosas na córnea, e liberação intraocular de prostaglandinas. O potencial hidrogeniônico (pH) do humor aquoso aumenta dentro de 3 a 5 minutos depois da queimadura por hidróxido de sódio, retornando ao normal no período compreendido entre 30 minutos e 3 horas. O reparo da lesão corneana após a injúria pelo álcali que ocorre através das células epiteliais é inibido pela persistente inflamação e dano na membrana basal do epitélio. Além disso, ocorre o crescimento de epitélio conjuntival na superfície corneana, NV superficial e profunda, persistência de células calciformes e erosões epiteliais recorrentes devido a adesão epitelial anormal da membrana basal (WAGONER, 1997).

As células epiteliais intactas secretam citocinas como IL-1Ra receptor antagonista e TGF- β , que inibem a produção de colagenase tipo I dos ceratócitos do estroma, porém com a injúria química, esse mecanismo homeostático é rompido (STRISSEL et al., 1995). Após 12 horas da injúria química ocorre a infiltração das células inflamatórias (polimorfonucleares e mononucleares) da

periferia corneana, através dos vasos perilesionais do limbo corneano e conjuntiva. Essas células são quimioatraídas pelos produtos das células epiteliais e tecido degradado do estroma.

Se a injúria alcalina é severa, ocorre isquemia ou necrose de vasos limbares, penetração intraocular com isquemia do segmento anterior; além disso, ocorre uma segunda onda de infiltração de células inflamatórias em torno do sétimo ao décimo quarto dia após a injúria. A infiltração de células inflamatórias estromais persiste enquanto se mantém o defeito do epitélio corneano, e conseqüente liberação de fatores para o estímulo da formação de neovasos corneanos (BROWN et al., 1970; WAGONER, 1997).

Na injúria por álcali na córnea, foi observado um aumento da expressão da IL-1 β (FUKUDA et al., 1997), e esta citocina foi envolvida na infiltração de macrófagos e no estímulo à NV corneana (DANA et al., 2007). Além disso, sua expressão na córnea foi mediada através da sinalização pelo NF- κ B de células do estroma e pela COX-2 (KUBOTA et al., 2011; NAKAO et al., 2007; KUWANO et al., 2004).

A IL-6 também apresentou expressão elevada na injúria por álcali na córnea, juntamente com a IL-1 β , e diminuição dos níveis de IL-10 (SOTOZONO et al., 1997). Além disso, a NV provocada por essa injúria, foi inibida pelo anticorpo do receptor solúvel IL-6R (SAKIMOTO et al., 2012; SARI, et al., 2014).

A injúria por NaOH na córnea de camundongos induziu estresse oxidativo, pela formação elevada de EROs, que precedeu a inflamação, e esse estresse foi considerado o principal ativador da NV corneana, bem como a ativação do fator de transcrição NF- κ B. A inibição desse principal fator nuclear envolvido no sistema redox do estresse oxidativo, suprimiu a infiltração de macrófagos e VEGF, nesse modelo (KUBOTA et al., 2011).

2.5 TERAPIA ANTI ANGIOGÊNICA NA NEOVASCULARIZAÇÃO CORNEANA

A inibição do processo de NV na córnea, seguindo os avanços do controle dos neovasos nos tecidos como a coróide e retina, tem sido amplamente estudada (GUPTA et al., 2011) e alguns exemplos dos estudos descritos a seguir: da inibição do VEGF com anticorpos monoclonais (BUCAK et al., 2014; DURSUN et al., 2012; FERRARI et al., 2013; KIM et al., 2014; KO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2010; OSDÉMIR et al., 2013; PAPATHANASSAIIOU et al., 2013; STEVENSON et al., 2012); da inibição de TNF- α (CADE et al., 2014; DANA et al., 2007; KIM et al., 2013); da inibição da IL-1 (COXON et al., 2002; DANA et al., 2007); da inibição da IL-6 (SAKIMOTO et al., 2012); da inibição do NF- κ B (SAIKA et al., 2005); da inibição das proteinases (JOVANOVIĆ et al., 2014; DAN et al., 2008; SOTOZONO et al., 1999; WENRU et al., 2011; XIAO et al., 2012); além de estudos com procedimentos através da fotocoagulação à laser de femtosegundo (SIDHU et al., 2014) e a terapia fotodinâmica (BUCHER et al.,

2014).

Apesar do grande interesse nos estudos sobre a NV na córnea, o seu controle representa um desafio para a integridade da visão e restabelecimento da acuidade visual (BACHMANN; TAYLOR, 2013).

Kubota e colaboradores (2011) descreveram a importância da uma abordagem preventiva do ponto de vista terapêutico da NV da córnea, nos casos de injúria por álcali, com o uso de antioxidantes.

2.6 FLAVONÓIDES

Os flavonóides, considerados primeiramente como antioxidantes, são metabólitos secundários das plantas, concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (DORNAS et al., 2009), e representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os compostos de origem vegetal.

Os flavonóides possuem uma estrutura comum, consistindo em dois anéis aromáticos (A e B) ligados entre si por um anel heterocíclico (anel C). Com base no estado de oxidação, nos grupos funcionais ligados ao anel C e da ligação dos anéis B e C, os flavonóides podem ser divididos em diferentes subclasses: flavonóis, flavonas, flavanóis, antocianidinas, flavanonas, e isoflavonas (NARAYANA et al., 2000; PELUSO; RAGUZZINI; SERAFINI, 2003) Figura 1.

Figura 1 - Estrutura Básica do Flavonóide

Fonte: Adaptado de Egert e Rimbah (2011).

A atividade antioxidante está relacionada, geralmente, com a estrutura química do flavonóide, de acordo com o número de grupos hidroxil presentes na sua constituição. Assim, quanto maior o número de substituintes hidroxilo, mais forte será a atividade do composto flavonóide (HAVSTEEN et al., 2002).

As atividades biológicas dos flavonóides tem sido amplamente relatadas e seu interesse está relacionado aos benefícios demonstrados pelos potentes efeitos antioxidantes (CAMPANINI et al., 2014; CASAGRANDE et al., 2006; GEORGETTI et al., 2013; IVAN et al., 2014; KIM et al., 2004; MANSURI et al., 2014, MOON; YANG; PARK, 2006; SHEN et al., 2014) através de vários mecanismos como, eliminação de radicais livres, quelação de íons e inibição enzimática do sistema redox (MOJZISOVÁ; KUČHTA, 2001; PELUSO; RAGUZZINI; SERAFINI, 2013).

Os flavonóides também inibem a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária, contração da musculatura lisa, e sistemas enzimáticos relacionados à produção de eicosanóides, incluindo fosfolipase A2, COX e LOX, reduzindo assim a produção e liberação de prostanóides e leucotrienos (KIM et al., 2004). Devido a essas propriedades e sua significativa atividade *in vivo*, os flavonóides tem sido considerados como agentes anti-inflamatórios. Essa atividade anti-inflamatória é também resultante da sua capacidade de interação com várias enzimas-chaves, envolvendo citocinas, fatores de transcrição reguladores e sistemas antioxidantes, além de apresentar um papel inibidor na via do NF- κ B, (GOMES et al., 2008).

Alguns exemplos dos estudos com flavonóides são os relacionados com o efeito cardioprotetor (MOJZISOVA; KUČHTA, 2001); antidiabetogênico (FERNANDES et al., 2009; KONATE et al., 2014; OMOLOLA; AYEPOLA; OGUNTI, 2014; VAN DAM; NAIDOO; LANDBERG, 2013); neuroprotetor (MURSU et al., 2008; NAKAYAMA et al., 2011; SINGH; CHOPRA, 2014); protetor do sistema digestivo (LEE et al., 2005, PARK et al., 2005; GUAZELLI et al., 2013); antidepressivo (PATHAK; AGRAWAL; DHIR, 2013); efeito analgésico (BORGHI et al., 2013, MARTINEZ et al., 2013; WANG et al., 2014); anticarcinogênico (BENAVENTE-GARCIA; CASTILHO, 2008; YANG et al., 2014); na periodontite (NAPIMOGA et al., 2013) e na ação antiangiogênica (KANDASWAMI et al., 2005; PEPPER et al., 2004; REN et al., 2003).

A naringenina é um flavonóide da classe flavanonas, mais encontrado nas frutas cítricas (COELHO et al., 2013), na forma glicosilada, e quando metabolizado pela microflora bacteriana do intestino humano, se transforma na sua forma agliconada (forma livre). Apresenta característica de

maior facilidade em solventes apolares, ou seja, é lipofílica, devido sua estrutura molecular. O caráter lipofílico é importante para seu desempenho, pela penetração, percurso entre a administração e o local de atuação (MULLIE et al., 2007; FRANKE et al., 2007, GOMES et al., 2008; PARK et al., 2007). Figura 2.

Em estudos prévios dos efeitos da naringenina, foram relatadas a inibição dos mediadores pró-inflamatórios como o NO e prostaglandinas E2, induzidos por lipopolissacarídeos, através da regulação negativa da expressão de óxido nítrico sintase induzível e COX-2. Além disso, ela atenuou a produção da citocinas IL-1 β TNF- α a proteína quimioatrativa de monócitos MCP-1, pela supressão da sua atividade de transcrição do NF-kB, e pela inibição da formação de ácido hipocloroso, uma EROs gerada por macrófagos e neutrófilos ativados (PARK; KIM; CHOI, 2012; NIE et al., 2012). A naringenina demonstrou ainda efeito inibidor da mieloperoxidase (MPO), enzima secretada pelos neutrófilos ativados e relacionada com a sinalização celular (NISHIMURA et al., 2013).

O pré tratamento com a naringenina apresentou inibição do estresse oxidativo de células cardiomioblásticas, através da sinalização da proteína NrF2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), importante fator de transcrição nuclear na ativação de genes relacionadas com enzimas antioxidantes, além da inibição da depleção da GSH e da peroxidação lipídica (RAMPRASATH et al., 2014).

A ingestão de mais de 100 ml/dia de suco de laranja (sem adição de açúcar) foi associada à diminuição da expressão genética de TNF- α IL-6 e receptor IL-1 em células mononucleares do sangue periférico (COELHO et al., 2013).

A naringenina apresentou associação com atividade anti-inflamatória, e antioxidante (PELUSO; RAGUZZINI; SERAFINI, 2013, CAVIA-SAIZ et al., 2010), capacidade de inibir a proliferação de células cancerosas (ANAND et al., 2012; ARUL; SUBRAMANIAN, 2013; BENAVENTE-GARCIA; CASTILLO, 2008; LI et al., 2014; LOU et al., 2012; MEIYANTO HERMAWAN; ANINDYAJATI, 2013; MUTHAIAH et al., 2013; SABARINATHAN; MAHALAKSHMI; VANISHER, 2011), neuroproteção, (COELHO, 2013, NIE et al., 2012; SABARINATHAN; MAHALAKSHMI; VANISHER, 2011), inibiu a asma alérgica (IWAMURA, 2010) e apresentou ação imunomoduladora (YILMA et al., 2013).

Figura 2 - Naringenina

Flavanonas

Fonte: Adaptado de Egert e Rimbah (2011).

No olho, a ação da naringenina foi avaliada na retina, nos estudos de Kara et al. (2014), e demonstrou capacidade de inibir da enzima caspase 3, importante proteína envolvida na apoptose das células retinianas, na lesão isquêmica. Além disso, a naringenina inibiu a expressão da COX2 e iNOS na retina, principais fatores envolvidos na inibição da expressão do VEGF e inibiu a expressão do seu mRNA. A naringenina ainda inibiu a expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, aumentou o fluxo sanguíneo coroidal e preveniu a neovascularização coroidal (JI; XU; CHIOU, 2009; SHEN; ZHANG; CHIOU, 2010; XU et al., 2014).

Considerando as evidências atribuídas a naringenina em apresentar as atividades anti-inflamatórias, antioxidante e antiangiogênica, foi estimado que esse flavonóide pudesse exercer tais efeitos terapêuticos no modelo de NV na córnea.

O modelo de NV corneana induzido pela injúria através do álcali, também considerado uma das principais causas de cegueira em humanos e ainda sem um tratamento efetivo, apresenta características de indução da angiogênese pelo processo inflamatório e estes, envolvidos no estresse oxidativo. Portanto, a efeito da naringenina na inflamação corneana, pela avaliação da migração leucocitária e expressão de citocinas inflamatórias, além da capacidade antioxidante e inibição da NV corneana foi realizada nesse modelo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a eficácia terapêutica da naringenina na redução do processo de angiogênese inflamatória em córnea de camundongos induzida por álcali.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do efeito terapêutico ocular da naringenina tópica sobre o infiltrado de neutrófilos e macrófagos através de marcadores Mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D glucosaminidase (NAG), no modelo de NV induzida por álcali em olhos de camundongos;
- Avaliar a formação da neovascularização corneana clínica pela injúria por álcali e o efeito da naringenina topica através da análise biomicroscópica, pela pelo sistema digital.
- Avaliar o efeito terapêutico ocular da naringenina tópica sobre a produção de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 no modelo de NV induzida por álcali em olhos de camundongos;
- Avaliar o efeito terapêutico tópico da naringenina no estresse oxidativo através da atividade da capacidade total antioxidante, pelos ensaios do poder de redução férrico (FRAP), e capacidade sequestradora do 2,2'-Azinobis-(3-Etilbenzotiazolina 6-Sulfonico) (ABTS), pela manutenção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e dos grupos sulfidrila de proteínas (PSH), no modelo de NV induzida por álcali em olhos camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados para este estudo um total de 572 camundongos Swiss machos (20-25g). Os animais criados no Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina – UEL, foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina pelo menos 2 dias antes dos experimentos. Os camundongos ficaram alojados em gaiolas convencionais de propileno (300x195x130mm) com tampa de metal e com divisórias para ração e água. Os camundongos tiveram livre acesso à comida (ração específica para roedores de laboratório) e água (água da torneira em uma mamadeira específica para esta finalidade). Quanto à lotação, o número máximo de camundongos foi de cinco camundongos/por gaiola (área de 585mm²). O biotério onde foram mantidos os animais em suas respectivas gaiolas é equipado com ar condicionado, exaustores de ar e ciclo claro/escuro de 12h. Os animais foram humanamente tratados e todos os procedimentos estiveram de acordo com os cuidados aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da Universidade Estadual de Londrina (processo 013/2013). Todos os procedimentos foram conduzidos sob condições estéreis.

Os camundongos foram anestesiados por meio de injeção intramuscular com associação de quetamina 80 mg/Kg (Ketalar –Pfizer, Br) e xilazina 10mg/kg (Virbaxyl-Virbac, Br), complementação com anestesia tópica ocular com cloridrato de propacaína 0.5% (Anestalcon–Alcon, Br).

Após o procedimento anestésico, foi utilizada a solução alcalina (NaOH, 1N) nos olhos de camundongos. O NaOH foi administrado através de papel filtro de 2 mm de diâmetro, embebido de forma homogênea nessa solução por 15 segundos, aplicado na córnea por 10 segundos, seguido da escarificação epitelial com lâmina 15, e logo após esse procedimento, a córnea foi irrigada com 20 ml de NaCl 0,9% (ORMEROD et al., 1989).

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.2.1 Naringenina

A Naringenina (98% de pureza) foi adquirida da Sigma-Aldrich, e preparada com solução isotônica de NaCl 0.9%, imediatamente antes de instilada no olho direito dos animais, nas seguintes concentrações 0,01, 0,1, 1,0 e 10g/L. A suspensão de naringenina, após agitar, foi instilada no olho

direito de cada animal, através da microgota (8 μ l), duas vezes ao dia, com início 3 dias antes do procedimento de indução de NV na córnea por NaOH, até 7 dias após a injúria (Figura 3).

Figura 3 - Ilustração da administração da microgota de 8 μ l salina ou naringenina nos grupos controles e tratados

Fonte: Autora.

Foram realizados 4 experimentos distintos para a análise da eficácia da naringenina tópica ocular: (1) no primeiro experimento foram realizadas as análises para determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) e n-acetil β -D glucosaminidase (NAG), marcadores da infiltração de neutrófilos e macrófagos no olho, realizadas no terceiro e sétimo dia após a injúria alcalina; (2) no segundo experimento, foram realizadas as análises da NV pela observação direta, através de imagens biomicroscópicas digitais, com avaliações no terceiro e sétimo dia após a injúria alcalina; (3) no terceiro experimento foram realizadas as análises da expressão das citocinas IL-1, IL-6 e IL-10; (4) no quarto experimento foram realizadas as análises de estresse oxidativo da córnea, pelos ensaios do FRAP e ABTS, além das medidas dos níveis de GSH e PSH. Tanto as análises das citocinas como de estresse oxidativo foram nas medidas realizadas 2, 4 e 6 horas após a injúria alcalina corneana, como segue exemplificado abaixo (Figura 4):

Figura 4 - Linha do tempo dos ensaios realizados em relação a injúria com NaOH e administração da naringenina tópica na córnea.

Fonte: autora

4.2.2 Determinação de Infiltração de Leucocitos na Córnea

Para a determinação de mieloperoxidase (MPO) e N-Acetil B-D glucosaminidase (NAG), os animais foram divididos em grupos de cinco animais: 1) controle negativo, sem estímulo neovascular através da injúria (NaOH, 1N); 2) grupo apenas com naringenina, sem injúria com NaOH; 3) grupo controle positivo com injúria corneana (NaOH), tratado com solução fisiológica (NaCl 0,9%); 4) grupo com injúria corneana tratado com diferentes dose de naringenina naringenina 0,08 μ g; 5) grupo com injúria corneana tratado com naringenina 0,8 μ g; 6) grupo com injúria corneana tratado com naringenina 8 μ g; 7) grupo com injúria corneana tratado com naringenina 80 μ g. Somente o olho direito dos camundongos foram submetidos a injúria por NaOH e tratados com naringenina colírio tópico ou NaCl 0,9%. Os ensaios foram realizados através do globo ocular direito eviscerado como amostra. Após o sacrifício dos animais, os olhos foram coletados no terceiro e sétimo dia após o estímulo neovascular através da injúria na córnea. Total de animais nesta etapa: 5 animais por grupo x 7 grupos= 35 animais x 2 etapas x 2 repetições do experimentos = total de 140 animais.

4.2.2.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A enzima MPO, presente em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica, tem papel fundamental na produção de EROs. A determinação da atividade da MPO é utilizada para avaliar a migração de leucócitos para um determinado tecido (CASAGRANDE et al., 2006), assim, este teste foi utilizado para verificar o acúmulo de neutrófilos no tecido ocular no modelo de NV inflamatória induzida por álcali através de solução de NaOH, 1N.

A amostra do globo ocular, obtida após a evisceração foi colocada em solução tampão de K_2HPO_4 (pH 6,0), contendo 0,5% de bromido de hexadecil-trimetilamônio (HTAB). As amostras foram homogeneizadas com auxílio de Polytron® (PT3100) e centrifugadas a 14000rpm, 4°C, por 2 minutos e o sobrenadante coletado e analisado por espectrofotometria de atividade de MPO em comprimento de onda de 450nm. Brevemente, 10 μ l de amostra do sobrenadante foram misturadas com 200 μ l de solução tampão de fosfato 50mM em pH 6,0, contendo 0,167mg/ml de dihidroclorato de O-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. A atividade da MPO foi então comparada a uma curva padrão de neutrófilos e o resultado expresso pelo número de neutrófilos $\times 10^4$ /olho (CASAGRANDE et al., 2006; VALÉRIO et al., 2007).

4.2.2.2 Determinação de atividade de N-Acetil B-D glucosaminidase (NAG)

A determinação da atividade de n-acetil- β D glucosaminidase, descrita por Navarro et al. (2013), foi realizada com algumas modificações. NAG é usada como marcador indireto de recrutamento de macrófagos. Brevemente, 40 μ l de subrenadante, obtido no mesmo ensaio para

MPO, foram colocadas placas com 96 poços, seguida de adição de 80 μ l de solução tampão 50 mM fosfato (pH 6.0). A reação foi iniciada pela adição de 2.24 mM 4-nitrofenil N-acetil- β D glucosaminidase. A placa foi encubada a 37°C, para a hidrólise enzimática do substrato com liberação do íon p-nitrofenilato. A ação enzimática foi interrompida com a adição de solução tampão de adiglicina (pH 10.6). O produto da reação foi medido em espectrofotômetro, em 400 nm, (Multiskan GO ThermoScientific). A atividade de NAG foi comparada com amostras padrão de curva de macrófagos e apresentada como atividade em números de macrófagos $\times 10^3$ /mg por olho.

4.2.3 Identificação da Neovascularização Corneana Através da Avaliação Clínica Fotográfica Digital Através Biomicroscópio

A análise da clínica da NV corneana foi realizada através da fotografia digital pelo biomicroscópio binocular óptico, com sistema HS 5000 (Sistema de Vídeo e Captura de Imagem - Huvitz®). Para a análise da imagem corneana foi utilizado o programa de computador de domínio público denominado ImageJ 1.45x (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Java 1.6.0_02) e a avaliação da neovascularização foi realizada por porcentagem de área com neovasos, expressos em mm², convertidas dos valores em pixel da fotografia digital pelo sistema Imagej (KIM; CHUNG, 2013).

Para esta análise, os grupos foram divididos os 7 grupos de 5 animais, com a mesma configuração para a análise de MPO e NAG. **1) grupo controle negativo**, sem estímulo neovascular com NaOH; **2) grupo** sem estímulo neovascular e tratado somente com 80 µg de naringenina; **3) grupo** com injúria corneana pelo NaOH, tratado solução isotônica (NaCl 0,9%); **4) grupo** com injúria corneana pelo NaOH, tratado com naringenina colírio tópico foi subdividida em 4 grupos: 0,08, 0,8, 8 e 80 µg;

A avaliação clínica da NV através do registro fotográfico digital pelo biomicroscópio foi realizada no terceiro e sétimo. Portanto nessa etapa, foram 7 grupos de 5 animais, total de 35 animais, avaliados em 2 etapas, tempo 3 e 7 dias (x2), testes avaliados em 2 repetições (x2) . Total de animais=140 animais

Figura 5 - Imagem da cornea para a avaliação da neovascularização por porcentagem de área, expressos em mm², convertidas dos valores em pixel da fotografia digital pelo sistema Imagej

Fonte: Autora.

4.2.4 Avaliação da Produção de Citocinas

A avaliação das citocinas IL-1 β , IL-6, importantes mediadoras inflamatórias, foram obtidas através da modulação da sua produção, além da avaliação da citocina IL-10, considerada uma citocina anti-inflamatória, tornando-se mediadoras fundamentais na fase de resolução desse processo. Para avaliação dessas citocinas, tão bem como para avaliação de atividade antioxidante, a dose escolhida da naringenina para os grupos tratados foi de 80 μ g. Essa dose apresentou diferença significativa na inibição da NV na análise clínica pela biomicroscopia digital e valores mais significativos na análise de infiltração de neutrófilos e macrófagos.

Os animais foram divididos em 4 grupos de 6 animais: 1) grupo controle negativo, sem estímulo neovascular com NaOH; 2) grupo sem estímulo neovascular e tratado com naringenina 80 μ g; 3) grupo com injúria corneana pelo NaOH, tratado solução isotônica (NaCl 0,9%); 4). grupo com injúria corneana pelo NaOH, com naringenina 80 μ g. As amostras foram obtidas através do globo ocular eviscerado 2, 4 e 6 horas após o estímulo neovascular com NaOH. Total de animais utilizados nessa etapa: 6 animais por grupo x 4 grupos=24 animais x 3 tempos (2, 4 e 6 horas) x 2 repetições dos experimentos= 144 animais.

A determinação da citocinas foram realizadas pelo método enzimático de reações por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (LEE, 1991) com kits comerciais, que para essas citocinas são amplamente disponíveis.

Após coletados, os olhos foram homogeneizados em solução Tampão Fosfato Salina (PBS) contendo: 0,4M de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina bovina sérica (BSA), 0,1mM de fenil-metil-sulfonil de flúor, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI ml⁻¹ aprotinina (Sigma). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm/ 10min) e o sobrenadante utilizado para avaliar os níveis de citocinas por ELISA.

Brevemente, placas de 96 poços foram incubadas por toda à noite a 4°C com anticorpos contra as proteínas de interesse (10 μ g/ml). No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por 2 horas com uma solução a 1% de albumina bovina no intuito de evitar ligações inespecíficas. Após esse bloqueio e lavagem das placas, as curvas-padrão em várias diluições ou as amostras (em triplicata) foram adicionadas e incubadas a 4°C por 24 h. As placas foram lavadas três vezes com

tampão e os anticorpos policlonais biotinilados diluídos 1/2.000, adicionados (100 µl/poço). Após incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 50 µl de avidina-HRP diluídas 1:5000 foi adicionada. Em seguida (trinta minutos após), 50 µl do reagente colorido ortofenileno-diamina (OPD) (solução 0,4 mg OPD – 0,4 µl H₂O₂ – 1 ml tampão) foi adicionado e as placas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente, por 15-20 min. A reação enzimática será interrompida com H₂SO₄ (1 M, 50 µl poço -1) e as absorvâncias foram determinadas em 490 nm. Os resultados foram obtidos comparando a densidade óptica com as densidades das curvas padrões.

4.2.5 Avaliação do estresse oxidativo

4.2.5.1 Avaliação da Capacidade Antioxidante Total da córnea pelos ensaio de ABTS e FRAP

Para os ensaios de FRAP e ABTS, os camundongos foram divididos em 4 grupos: 1) grupo controle, sem estímulo neovascular com NaOH, 1N; 2) grupo sem estímulo neovascular com NaOH e tratado naringenina 80ug; 3) grupo com injúria corneana pelo NaOH, tratado com solução isotônica (NaCl 0,9%); 4) grupo com injúria corneana pelo NaOH, tratado com naringenina 80ug. As amostras foram obtidas através do globo ocular eviscerado 2, 4 e 6 horas após o estímulo neovascular com NaOH. Total de animais: 6 animais por grupo x 4 grupos= 24 animais x 3 tempos (2, 4 e 6 horas após estímulo através da injúria por alcali) x 2 repetições dos experimentos= 144 animais.

A capacidade antioxidante total de fluídos biológicos, células e tecidos são avaliados pela formação de radicais cátion 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonônico) (ABTS^{•+}). A determinação da capacidade antioxidante total foi realizada por meio das amostras coletadas dos olhos, imediatamente pesadas em um homogenato preparado com solução de KCl 1,15% gelado para a concentração de 20% peso/volume. As amostras foram centrifugadas (200 x g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi retirado para análise pelo ensaio do (ABTS) (KATALINIC et al., 2005). A solução de ABTS foi preparada com 384 mg de ABTS + 66,23 mg de persulfato de potássio para 100 mL de solução final (tampão fosfato), mantido a solução em frasco escuro por 16 horas em temperatura ambiente antes do uso. Essa solução foi diluída ABTS com tampão fosfato (pH 7,4) até atingir uma absorvância de 0,8 a 730 nm. Aproximadamente 500 µL de ABTS para 20 mL de tampão. O sobrenadante foi adicionado à essa solução de ABTS^{•+} diluída e as amostras misturadas em vortex. Após 6 min as absorvâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 734 nm. A curva padrão foi preparada utilizando diferentes concentrações de Trolox para posterior cálculo dos resultados em mMol equivalente de Trolox/g de córnea.

O FRAP, indica menor capacidade de ligação da ferritina ao ferro e, conseqüentemente, maior quantidade de ferro livre, capaz de catalisar a geração de radicais OH[•], por meio das reações de

Fenton e Haber-Weiss (KATALINIC et al., 2005). Para o ensaio do FRAP, 50 μ L do sobrenadante foi misturado com 150 μ L do reagente de FRAP, previamente preparado conforme descrito por Katalinic et al. (2005), no poço da microplaca. Após uma incubação de 30 min a 37 °C, as absorbâncias das amostras foram determinadas por espectrofotometria a 595 nm. Para cada ensaio uma curva padrão utilizando Trolox foi preparada em diversas concentrações, para posterior cálculo dos resultados expressos em mMol equivalente de Trolox/mg de córnea.

4.2.5.2 Quantificação da Glutathiona Reduzida (GSH) e grupos sulfidrilas totais (PSH)

A glutathiona é um antioxidante hidrossolúvel que pode ser encontrada na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). Numerosas proteínas contém grupos sulfidrilas, ou tiol (-SH) e esses grupos PSH ou cisteínas também estão presentes nas células e tecidos. A oxidação da forma tiol de uma enzima ou a redução da forma dissulfeto pode resultar em ativação ou inativação da sua função. Tanto GSH e grupos sulfidrilas PSH são considerados marcadores de estresse oxidativo celular. A determinação de seus níveis foi realizado por espectrofotometria (412nm) de acordo com o método proposto por Titzte (1969) e os resultados foram expressos em μ mol/mg de Proteína.

Para a análise dos níveis de GSH e PSH, os animais foram divididos em 4 grupos: **1) grupo controle**, sem estímulo neovascular com NaOH; **2) grupo** sem estímulo neovascular com NaOH e tratado com suspensão naringenina 80 μ g; **3) grupo** com injúria corneana pelo NaOH, tratado solução isotônica (NaCl 0,9%); **4) grupo** com injúria corneana pelo NaOH, tratado com naringenina 80 μ g. As amostras foram obtidas através do globo ocular eviscerado 2, 4 e 6 horas após o estímulo neovascular com NaOH. Total de animais: 6 animais por grupo x 4 grupos= 24 animais x 3 tempos (2, 4 e 6 horas após estímulo através da injúria por NaOH) x 2 repetições dos experimentos= 144 animais.

A determinação dos níveis de GSH e PSH, foram obtidas pelo amostras do globo ocular eviscerado, coletado e homogeneizado em EDTA 0,02 M gelado. Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético 50% (TCA) e as amostras misturadas em vortex e, após 15 min, centrifugadas (1.500 x g, 15 min, temperatura ambiente). Uma alíquota foi utilizada sem a adição de TCA (utilizada para sulfidrilas totais, PSH), enquanto outra alíquota foi tratada com TCA e utilizada para GSH. O sobrenadante foi adicionado ao Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9) e ao ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) e em seguida misturado em vortex. O desenvolvimento de cor ocorreu pela reação dos grupos tíois com DTNB, e conseqüentemente, liberação de TNB, cujas absorbâncias foram medidas fotometricamente após 5 min, a 412 nm. Uma curva padrão foi preparada utilizando GSH e PSH em diferentes concentrações, e os resultados expressos em μ mol GSH/g córnea e PSH/g córnea (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

5 ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com mais de uma variável como tempo e tratamentos, assim, foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância multivariada (ANOVA). As diferenças estatísticas entre os grupos serão comparadas por ONE-WAY ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Para a análise estatística foi utilizado o GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA). Foram consideradas significativas diferenças para $P < 0.05$.

REFERÊNCIAS

- ABU EL-ASRAR, A. M. et al. Chemokines in the limbal form of vernal keratoconjunctivitis. *British journal of ophthalmology*, London, v. 84, n. 12, p. 1360-1366, 2000.
- AGGARWAL. B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology*, London, v. 3, n. 9, p.745-756, 2003.
- AGGARWAL. B. B.; GUPTA, S. C.; KIM, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, New York, v.119, n. 3, p. 651-665, Jan. 2012
- AGGARWAL. B. B.; MOFFAT, B.; HARKINS, R. N. Human lymphotoxin: production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *The Journal of biological chemistry*, Bethesda, v. 259, n. 1, p. 686-691, 1984.
- AMANO, S. et al. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, n. 39, p.18-22, Jan. 1998.
- AMBATI, J.; FOWLER, B. J. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*, Cambridge, v.75, n. 1, p. 26-39, Jul. 2012.
- AMPARO, F. et al. Safety and efficacy of the multitargeted receptor kinase inhibitor pazopanib in the treatment of corneal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*, Philadelphia, v. 54, n.1, p. 537-544, 2013.
- ANAND, K. L. et al. Combinatorial antitumor effect of naringenin and curcumin elicit angioinhibitory activities in vivo. *Nutrition and cancer*, Philadelphia, v. 64, n. 5, p. 714-724, 2012.
- ARUL, D. Subramanian P.Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Pathology oncology research*, Budapest, v. 19, n. 4, p. 763-770, May 2013.
- AUERBACH, R. et al. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clinical chemistry*, Baltimore, v. 49, n. 1, p. 32-40, Jan. 2003.
- AUERBACH, W.; AUERBACH, R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacology & therapeutics*, Oxford, v. 63, p. 265-311, 1994.
- AZAR, D. T. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*, San Francisco, v. 104, p. 264-302, 2006.
- BACHMANN, B.; TAYLOR, R. S.; CURSIEFEN, C. The association between corneal neovascularization and visual acuity: a systematic review. *Acta ophthalmologica*, Oxford, v. 91, n. 1, p. 12-19, Feb. 2013.
- BAEHNER, R. L.; GILMAN, N.; KARNOVSKY, M. L. Respiration and glucose oxidation in human and guinea pig leukocytes: comparative studies. *The Journal of clinical investigation*, New Haven, v. 49, p. 692-700, 1970.
- BALASUBRAMANIYAN, V.; KALAIVANI SAILAJA, J.; NALINI, N. Role of leptin on alcohol-oxidative stress in Swiss mice. *Pharmacological research*, London, v. 47, n. 3, p. 211-216, Mar. 2003.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 23, n. 4, Aug. 2010. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 7 maio 2014.

BAZAN, H.; OTTINO, P. The role of platelet-activating factor in the corneal response to injury. *Progress in retinal and eye research*, Oxford, v. 21, n. 5, p. 449-642, Sep. 2002.

BEEBE, D. C. Maintaining transparency: a review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues. *Seminars in cell & developmental biology*, London, v. 19, p. 125-133, 2008.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings o. in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, Washington, v. 56, n. 15, p. 6185-6205, 2008.

BICAS, H. E. A. Morfologia do sistema visual. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 30, n. 1, 1997.

BITEMAN, B. et al. Interdependence of lipoxin A4 and heme-oxygenase in counter-regulating inflammation during corneal wound healing. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Bethesda, v.21, n. 9, p. 2257-2266, July, 2007.

BORGHI, S. M. et al. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *Journal of natural products*, Cincinnati, v. 76, n. 6, p. 1141-1149, Jun. 2013.

BOWIE, A. G.; O'NEILL, L. A. Vitamin C inhibits NF-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of immunology*, Baltimore, v. 165, n. 12, p.7180-7188, Dec. 2000.

BUCAK, Y. Y. et al. Inhibitory effects of topical cyclosporine A 0.05% on immune-mediated corneal neovascularization in rabbits. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, Berlin, v. 251, n. 11, p. 2555-2561, 2013.

BUCHER, F. et al. Regression of mature lymphatic vessels in the cornea by photodynamic therapy. *British journal of ophthalmology*, London, v. 98, n. 3, p. 391-395, Mar. 2014.

BYUN, Y. S.; CHUNG, S.K. The effect of methotrexate on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea*, Philadelphia, v. 30, n. 4, p. 442-446, Apr. 2011.

CADE, F. et al. Alkali Burn to the Eye: protection Using TNF-a Inhibition. *Cornea*, Philadelphia, v. 33, n. 4, p. 382-339, 2014.

CAMPANINI, M. Z. et al. Topical formulations containing Pimenta pseudocaryophyllus extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. *AAPS PharmSciTech*, New York, v. 15, n. 1, p. 86-95, Feb. 2014.

CAMPBELL, L. M.; MAXWELL, P. J.; WAUGH, D. J. Rationale and Means to Target Pro-Inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer. *Pharmaceuticals*, Basel, v. 6, n. 8, p. 929-959, Aug. 2013.

CAMPOCHIARO, P. A. Ocular neovascularization. *Journal of molecular medicine*, Berlin, v. 91, n. 3, p. 311-321, Mar. 2013.

CAMPOCHIARO, P. A.; HACKETT, S. F.; VINOES, S. A. Growth factors in the retina and retinal pigmented epithelium. *Progress in retinal and eye research*, Oxford, n.15, p. 547-567, 1996.

CAMUSSI, G.; TETTA, C.; BAGLIONI, C. C. The role of platelet-activating factor in inflammation. *Clinical immunology and immunopathology*, New York, v. 57, n. 3, p. 331-338, Dec. 1990.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, London, v. 438, n. 7070, p. 932-936, Dec. 2005.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, London, v. 473, n. 7347, p. 298-307, May 2011.

CARMI, Y. et al. The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis. *The journal of immunology*, Baltimore, v. 183, n. 7, p. 4705-4714, Oct. 2009.

CASAGRANDE, R. et al. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS PharmSciTech*, Arlington, v. 7, n. 1, p. E64-E71, Mar. 2006.

CAVIA-SAIZ, M. et al. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the science of food and agriculture*, London, v. 90, n. 7, p.1238-1244, May 2010.

CEJKOVA, J. et al. Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface. *Experimental eye research*, London, v. 116, p. 312-323, Nov. 2013.

CHANG, J.H. et al. Corneal neovascularization. *Current opinion in ophthalmology*, Philadelphia, v.12, p. 242-249, 2001.

CHANG, J.H. et al. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Survey of ophthalmology*, New York, v. 57, n. 5, p. 415-429, Sep. 2012.

CHOI, H. S. et al. Quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of immunoassay & immunochemistry*, London, v. 27, n. 1, p. 31-44, 2006.

CLARE, G. et al. Amniotic membrane transplantation for acute ocular burns. *The Cochrane database of systematic reviews*, Oxford, n. 9, CD009379, 2012.

COELHO, R. C.; HERMSDORFF, H. H.; BRESSAN, J. Anti-inflammatory properties of orange juice: possible favorable molecular and metabolic effects. *Plant foods for human nutrition*, Dordrecht, v. 68, n. 1, p.1-10, Mar. 2013.

COHEN JR, M. M. Vascular update: morphogenesis, tumors, malformations, and molecular dimensions. *American journal of medical genetics*, Part A, Hoboken, v. 140, n. 19, p.2013-2038, Oct. 2006.

COHEN JUNIOR, M. M. Vasculogenesis, angiogenesis, hemangiomas, and vascular malformations. *American journal of medical genetics*, Hoboken, n. 108, p. 265-274, 2002.

COHEN, T. et al. Interleukin 6 Induces the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor. *The Journal of biological chemistry*, Baltimore, n. 271, p. 736-741, 1996.

COLE, N. et al. Effects of topical administration of 12-methyl tetradecanoic acid on the development of corneal angiogenesis. *Angiogenesis*. 10; 47-51. 2007

COOKE, J. P.; DOUGLAS, W. L. Nitric Oxide and Angiogenesis. *Circulation*, Dallas, v.105, p. 2133-2135, 2002.

COXON, A. et al. Inhibition of interleukin-1 but not tumor necrosis factor suppresses neovascularization in rat models of corneal angiogenesis and adjuvant arthritis. *Arthritis and*

rheumatism, Atlanta, v. 46, n. 10, p. 2604–2612, Oct. 2002.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 102, n. 5, p.1755-1760, 2005.

CURSIEFEN, C. et al. Aganirsen Antisense Oligonucleotide Eye Drops Inhibit Keratitis-Induced Corneal Neovascularization and Reduce Need for Transplantation: the I-CAN Study. *Ophthalmology*, Rochester, n. 14, p. 315-317, May 2014.

CURSIEFEN, C. et al. Corneal lymphangiogenesis:evidence, mechanisms, and implications for corneal transplantimmunology. *Cornea*, Philadelphia, n. 22, p. 273-281, 2003.

CURSIEFEN, C.; KUCHLE, M.; NAUMANN, G. O. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea*, Philadelphia, n. 17, p. 611–613, 1998.

DACE D. S. et al. Interleukin-10 Promotes Pathological Angiogenesis by Regulating Macrophage Response to Hypoxia during Development. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 3, n. 10, p. e3381, 2008.

DAN, L. et al. Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Current eye research*, London, v. 33, n. 8, p. 653-660, 2008.

DANA, M. R.; STREILEIN, J. W. Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, n. 37, p. 2485-2494, 1996.

DANA, R. Comparison of topical interleukin-1 vs tumor necrosis factor-alpha blockade with corticosteroid therapy on murine corneal inflammation, neovascularization, and transplant survival (an American Ophthalmological Society thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*, San Francisco, n. 105, p. 330-343, 2007.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine*, New York, v. 174, n. 5, p.1209-1220, Nov. 1991.

DESCH, C. E. et al. Tumor necrosis factor-alpha exhibits greater proinflammatory activity than lymphotoxin in vitro. *Blood*, New York, v. 75, n. 10, p. 2030-2034, 1990.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, New York, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, Mar. 1996.

DINARELLO, C. A. Review Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology*, Palo Alto, n. 27, p.519-550, 2009.

DORNAS, W. C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Araraquara, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2009

DUA, H. S. et al. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*, Rochester, v. 120, n. 9, p. 1778-85, Sep. 2013.

DUDA, D. G. Molecular biomarkers of response to antiangiogenic therapy for cancer. *ISRN Cell Biology*, Cairo, 2012.

- DULAK, J. et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Dallas, v. 20, p. 659-666, 2000.
- DURSON, A. et al. Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model. *International journal of Ophthalmology*, Xi'an, China, v. 5, n. 4, p. 448, 2012.
- EBIHARA, N. et al. Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 52, n. 12, p.8549-8557, Nov., 2011.
- EBRAHEM, Q. et al. Triamcinolone acetonide inhibits IL-6- and VEGF-induced angiogenesis downstream of the IL-6 and VEGF receptors. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 47, n. 11, p. 4935-4941, Nov. 2006.
- EDELMANJ, L.; CASTRO, M. R.; WEN, Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 40, n. 6, 1112-1123, May 1999.
- EGERT S.; RIMBACH, G. Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? *Advances in nutrition*, Bethesda, v. 2, n. 1, p. 8-14, Jan. 2011.
- ELNER, S. G. et al. Interferon-induced protein 10 and interleukin 8. C-X-C chemokines present in proliferative diabetic retinopathy. *Archives of ophthalmology*, Chicago, v. 116, n. 12, p. 1597-601, 1998.
- EPSTEIN, R. J. et al. Corneal neovascularization. Pathogenesis and inhibition. *Cornea*, Philadelphia, v. 6, n. 4, p. 250-257, 1987.
- FECHINE-JAMACARU, F. V.; FECHINE JUNIOR, J. U; MORAES, F. M. O. Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho induzida pela cauterização alcalina pontual. *Acta cirúrgica brasileira*, São Paulo, v. 20, n. 1, fev. 2005.
- FENG, W. et al. Loss of RPE phenotype affects phagocytic function. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, Berlin, v. 241, n. 3, p. 232-240, Mar. 2003.
- FERNANDES, A. A. H. et al. Effect of naringerin on biochemical parameters in the streptozotocin-induced diabetic rats. *Brazilian archives of biology and technology*, Curitiba, v. 52, n. 1, p. 51-59, Feb. 2009.
- FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International*. New York, n. 56, p. 794-814, 1999.
- FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LEUCOTER, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, New York, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.
- FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 161, p. 851-858, 1989.
- FERRARA, N.; KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, London, v. 438, n. 7070, p. 967-974, Dec. 2005.
- FERRARI, G. et al. Topical ranibizumab as a treatment of corneal neovascularization. *Cornea*,

Philadelphia, v. 32, n. 7, p. 992-997, Jul. 2013.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*, Boston, v. 285, p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 4-6, Jan. 1990.

FOLKMAN, J.; INGBER, D. Inhibition of angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, Philadelphia, v.3, n. 2, p. 89-93, 1992.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. *The journal of biological chemistry*, San Francisco, v. 267, p.10931-10934, 1992.

FRANKE, A. A. et al. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*, Washington, v. 53, p. 5170-5178, 2005.

FUJISHIMA H. et al. Prostaglandin D2 induces chemotaxis in eosinophils via its receptor CRTH2 and eosinophils may cause severe ocular inflammation in patients with allergic conjunctivitis. *Cornea*, Philadelphia, v. 24, Suppl. 8, p. S66-S70, Nov. 2005.

FUKUDA, M.; MISHIMA, H.; OTORI, T. Detection of interleukin -1b in the tear fluid of patients with corneal disease with or without conjunctival involvement. *Jpn J Ophthalmol*. v. 41, p. 63-66, 1997.

FUNATSU, H. et al. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*, Rochester, v. 110, n. 9, p. 1690-1696, Sep. 2003.

GALLUCCI, R. M. et al. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB Journal*, Bethesda, n. 14, p. 2525-2531, 2000.

GALLUCCI, R. M. et al. Interleukin-6 treatment augments cutaneous wound healing in immunosuppressed mice. *Journal of interferon & cytokine research*, New York, n. 21, p. 603-609, 2001.

GANEVA, E.; HARDING, J. J. Glutathione-related enzymes and the eye. *Current eye research*, London, v. 31, n. 1, p. 1-11, Jan. 2006.

GEORGETTI S.R et al. Protective effect of fermented soybean dried extracts against TPA-induced oxidative stress in hairless mice skin. *Biomed Res Int.*;2013:340626, 2013

GOME, S. A. et al. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, Netherlands, v. 15, n. 16, p. 1586-605, 2008.

GONÇALVES, R. M. et al. O papel das quimiocinas nas uveítes. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 363-370, Mar. 2007.

GOSTNER, J. M. et al. Redox regulation of the immune response. *Redox Report*, Edinburgh, v. 18, n. 3, p. 88-94, 2013.

GRANGER, D. N.; SENCHENKOVA, E. Angiogenesis. In: _____. *Inflammation and the Microcirculation*. San Rafael, CA: Morgan & Claypool Life Sciences, 2010. Chapter 6.

GROSSNIKLAUS, H. E. et al. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Molecular vision*, Atlanta Ga, n. 8, p. 119-126, 2002.

GUAZZELLI, C. F. Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-

inflammatory and antioxidant mechanisms. *Journal of natural products*, Cincinnati, v. 76, n. 2, p. 200-8, Feb. 2013.

GUEDES R. P. et al. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. *Neurochemical Research*, New York, v. 31, n. 5, p. 603–609, 2006.

GULATI, A. et al. Chemokine receptor CCR5 expression in conjunctival epithelium of patients with dry eye syndrome. *Archives of ophthalmology*, Chicago, v. 124, n. 5, p. 710-716, 2006.

GÜLER, M. et al. The inhibitory effects of trastuzumab on corneal neovascularization. *American journal of ophthalmology*, New York, v. 147, n. 4, p. 703-708, 2009.

GUPTA, D.; ILLINGWORTH, C. Treatments for Corneal Neovascularization: A Review. *Cornea*, Philadelphia, v. 30, n. 8, p. 927-938, Mar. 2011.

GUZIK, T. J.; HARRISON, D. G. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug discovery today*, London, n. 11, p. 524–533, 2006.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, Basel, n. 23, p.118-126, 1993.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, Oxford, v. 96, n. 2-3, p. 67–202, 2002.

HENRIKSSON, J. T; BRON, A. J.; BERGMANSON, J. P. G. An explanation for the central to peripheral thickness variation in the mouse cornea. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 40, n. 5, p. 174-181, 2012

HOEBEN, A. et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological reviews*, Baltimore, n. 56, p. 549-580, Dec. 2004.

HOHMANN, M. S. et al. 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *BioMed Research International*, New York, Oct. 2013

HONG, J. W. et al. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 42, p. 2795-2803, 2001.

HUISING, M. O. et al. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines: IL-18 in teleost fish. *Developmental and comparative immunology*, Elmsford, v. 28, n. 5, p. 395-413, 2004.

IMANISHI, J. et al. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Progress in Retinal and Eye Research*, Oxford, v. 19, n. 1, p. 113-129, Jan. 2000.

IVAN, A. L. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Lausanne, v. 27; n. 138C, p. 124-133, 2014.

IWAMURA, C. et al. Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. *Allergy International*, Tokyo, n. 59, p. 67-73, 2010.

Jl, J.; XU, X. R.; CHIOU, G. C. Y. Effects of naringenin on ocular blood flow and choroidal neovascularization in experimental animals. *International journal of Ophthalmology*, Xi'an, China, v. 2, n. 4, p. 320-323, 2009.

JOVANOVIC, V.; LJUBISA, N. The Effect of Topical Doxycycline on Corneal Neovascularization. *Current*

eye research, London, n. 0, p. 1-7, 2013.

KABUTO, H. et al. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environmental research*, New York, v. 93, n. 1, p. 31-35, sep. 2003.

KALISH, B. T. et al. The growing role of eicosanoids in tissue regeneration, repair, and wound healing. *Prostaglandins & other lipid mediators*, New York, n. 104-105, p.130-138, Jul-Aug., 2013.

KANDASWAMI, C. et al. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, Athens, v. 19, n. 5, p. 895-909, Sep.-Oct. 2005.

KARA, S. et al. Protective effect of hesperetin and naringenin against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats. *The Scientific World Journal*. New York, n. 2014, p. 797824, jan., 2014.

KATALINIC, V., et al. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, New York, v. 140, n. 1, p. 47-52, 2005.

KEELEY, E. C.; MEHRAD, B.; STRIETER, R. M. Chemokines as mediators of neovascularization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Dallas, v. 28, n. 11, p. 1928-1936 S, Nov., 2008.

KENCHEGOWDA, S. BAZAN, N.G.; BAZAN, H.E. EGF Stimulates lipoxin A4 synthesis and modulates repair in corneal epithelial cells through ERK and p38 activation. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 52, p. 2240–2249, 2011.

KENCHEGOWDA, S.; BAZAN, H.E.P. Significance of lipid mediators in corneal injury and repair. *Journal of lipid research*, Bethesda, v. 51, n. 5, p. 879–891, 2010.

KENYON, B. M. et al. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 37, p.1625-1632, July 1996.

KIM, E. K.; KONG, S. J.; CHUNG, S. K. Comparative Study of Ranibizumab and Bevacizumab on Corneal Neovascularization in Rabbits. *Cornea*, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 60-64, 2014.

KIM, H.P. et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, Kyoto, v. 96, n. 3, p. 229-245, Nov. 2004.

KIM, J.W.; CHUNG, S.K. The effect of topical infliximab on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea*, Philadelphia, v. 32, n. 2, p. 185-190, Feb. 2013.

KLENIEWSKA P. et al. The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, Warszawa, v. 60, n. 4, p. 277-294, Aug. 2012.

KO, Byung-Yi et al. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival and topical bevacizumab and sunitinib in a rabbit model. *Cornea*, Philadelphia, v. 32, n. 5, p. 689-695, 2013.

KOCH, A. E. et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, New York, n. 258, p. 1798–1801, 1992.

KOH, C. H.; LEE, H. S.; CHUNG, S. K. Effect of Topical Epigallocatechin Gallate on Corneal Neovascularization in Rabbits. *Cornea*, Philadelphia, v. 33, n. 5, p. 527-532, Mar. 2014.

KONATÉ, K. et al. Free Radicals Scavenging Capacity, Antidiabetic and Antihypertensive Activities of Flavonoid-Rich Fractions from Leaves of *Trichilia emetica* and *Opilia amentacea* in an Animal Model of

- Type 2 Diabetes Mellitus. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, Oxford, n. 2014, p. 867075, 2014
- KRACHMMER, J. H.; MANNIS, M. J.; HOLLAND, E. J. *Cornea*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005.
- KROLL, J.; WALTENBERGER, J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, New York, v. 265, n. 3, p. 636-639, Nov. 1999.
- KUBOTA, M. et al. Hydrogen and N-acetyl-L-cysteine rescue oxidative stress-induced angiogenesis in a mouse corneal alkali-burn model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 52, n. 1, p. 427-33, Jan. 2011.
- KUCHLE, M. et al. Risk factors for corneal allograft rejection: intermediate results of a prospective normal-riskkeratoplasty study. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, Berlin, n. 240, p. 580-584, 2002.
- KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, Tarrytown, v. 52, p. 2013-2037, 2012.
- KUNKEL, E. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity*, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 1-4, Jan. 2002.
- KUWANO, T. et.al. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB Journal*, Bethesda, v. 18, n. 2, p. 300-10, Feb. 2004.
- LEE, J. H. et al. Negative regulation of beta-catenin/Tcf signaling by naringenin in AGS gastric cancer cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 335, n. 3, p. 771-776, Sep. 2005.**
- LEE, P.; WANG, C. C.; ADAMIS, A. P. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Survey of Ophthalmology*, New York, v. 43, p. 245-269, 1998.
- LEE, T. H. Cellular activation and releasability in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *American Review of Respiratory Disease*, Baltimore, v. 143, n. 5, p. 1162-1164, 1991.
- LI, H. et al. 6-C-(E-phenylethenyl)-naringenin suppresses colorectal cancer growth by inhibiting cyclooxygenase-1. *Cancer research*, Chicago, v. 74, n. 1, p. 243-252, Jan. 2014.
- LI, W. W. et al. Sustained-release endotoxin. A model for inducing corneal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 32, n. 11, p. 2906-2911, Oct. 1991.
- LINGEN, M. W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, Chicago, n. 125, p. 67-71, 2001.
- LOPES, G. *Efeito do uso tópico e subconjuntival do Bevacizumabe (avastin®) na superfície ocular íntegra e na Neovascularização corneana de olhos de coelho*. 2008. 85f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- LOU, C. et al. Naringenin decreases invasiveness and metastasis by inhibiting TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e50956, 2012.
- MACKAY, F. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial

cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *The Journal of experimental medicine*, New York, v. 177, n. 5, p. 1277-1286, May, 1993.

MAGUIRE, M. G. et al. Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. *Ophthalmology*, Rochester, v. 101, n. 9, p. 1536-1547, 1994.

MANSURI, M. L. et al. Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes & nutrition*, New Orleans, v. 9, n. 3, p. 400, May 2014.

MARTINEZ, R. M. et al. Tephrosia sinapou ethyl acetate extract inhibits inflammatory pain in mice: opioid receptor dependent inhibition of TNF α and IL-1 β production. *Pharmaceutical biology*, London, v. 51, n. 10, p. 1262-1271, Oct. 2013.

MASAAKI, U. et al. An ophthalmic solution of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist prevents corneal inflammation in a rat alkali burn model. *Molecular vision*, Atlanta Ga, n. 19, p. 2135–2150, 2013.

MASFERRER, J. L. et al. Antiangiogenic and antitumour activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer research*, Chicago, n. 60, p. 1306-1331, 2000.

MATEO, R. B.; REICHNER, J. S.; ALBINA, J. E. Interleukin-6 activity in wounds. *The American journal of physiology*, Washington, v. 266, R1840–1844, 1994.

MATSUGO, S. et al. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. *Neuroscience letters*, Amsterdam, v. 278, n. 1-2, p. 105-108, Jan. 2000.

MEHTA, J. L. et al. Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *The international journal of biochemistry & cell biology*, Amsterdam, v. 38, n. 5, p. 794-803, 2006.

MEIYANTO, E.; HERMAWAN, A.; ANINDYAJATI. Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, Bangkok, v. 13, n. 2, p. 427-436, 2012.

MESQUITA JUNIOR, D. et al. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. *Revista Brasileira de Medicina*, São Paulo, n. 3, p. 66-81, Ago., 2010.

MOHAMMADPOUR, M. Managements for Corneal Neovascularization. *Cornea*, Philadelphia, v. 32, n.11, p. e190, 2013.

MOJZISOVÁ, G.; KUČHTA, M. Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiological research*, Praha, v. 50, n. 6, p. 529-535, 2001.

MOON, H. K.; YANG, E. S.; PARK, J. W. Protection of peroxynitrite-induced DNA damage by dietary antioxidants. *Archives of pharmacal research*, Coréia do Sul, v. 29, n.3, p. 213-217, Mar. 2006.

MORBIDELLI, L. et al. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *The American journal of physiology*, Washington, v. 270, n. 1 Pt 2, p. H411-415, Jan. 1996.

MORI, K. et al. Retina-specific expression of PDGF-B versus PDGF-A: vascular versus nonvascular proliferative retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 43, n. 6, p. 2001-2006, Jun. 2002.

MOSER, B.; LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. Review. *Nature immunology*,

New York, v. 2, n. 2, p. 123-128, 2001.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, London, v. 8, p. 958-969, 2008.

MOTRO, B. et al. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, n. 87, p. 3092-3096, 1990.

MULLIE, P. et al. Estimation of daily human intake of food flavonoids. *Plant foods for human nutrition*, Dordrecht, v. 62, n. 3, p. 93-98, 2007.

MURPHY, P. M. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacological reviews*, Baltimore, v. 54, n. 2, p. 227-229, 2002.

MURSU, J. et al. Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *The British journal of nutrition*, v. 100, n. 4, p. 890-895, Oct. 2008.

NAKAMURA, M.; NISHIDA, T. Differential effects of epidermal growth factor and interleukin 6 on corneal epithelial cells and vascular endothelial cells. *Cornea*, Philadelphia, v. 18, p. 452-458, 1999.

NAKAO, S. et al. Dexamethasone inhibits interleukin-1beta-induced corneal neovascularization: role of nuclear factor-kappaB-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, Philadelphia, v. 171, n. 3, p. 1058-65, Sep. 2007.

NAKAYAMA, M. et al. Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Molecular vision*, Atlanta Ga, v. 17, p.1784-1793, 2011.

NALDINI, A.; CARRARO, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, Hilversum, v. 4, p. 3-8, 2005.

NALDINI, A.; PUCCI, A.; CARRARO, F. Hypoxia induces the expression and release of interleukin 1 receptor antagonist in mitogen-activated mononuclear cells. *Cytokine*, San Diego, v. 13, n. 6, p. 334-341, 2001.

NAPIMOGA, M. H. et al. Quercetin inhibits inflammatory bone resorption in a mouse periodontitis model. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 76, n. 12, p. 2316-2, 2013.

NARAYANA, K. R. et al. Bioflavonoids classification, pharmacological. biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, Pondicherry, v. 33, p. 2-16, 2001.

NAVARRO, S. A. et al. Analgesic activity of piracetam: effect on cytokine production and oxidative stress. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, Phoenix, v. 105, p. 183-192, 2013.

NIE, Y. C. et al. Naringin attenuates EGF-induced MUC5AC secretion in A549 cells by suppressing the cooperative activities of MAPKs-AP-1 and IKKs-I κ B-NF- κ B signaling pathways. *European journal of pharmacology*, Amsterdam, v. 690, p. 207-213, 2012.

NIEDERKORN, J. Y. Corneal transplantation and immune privilege. *International reviews of immunology*, London, v. 32, n. 1, p. 57-67, 2013.

NISHIDA, T. et al. Interleukin 6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo. *Archives of ophthalmology*, Chicago, v. 110, p. 1292-1294, 1992a.

NISHIDA, T. et al. Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *Journal of cellular physiology*, New York, v. 153, p. 1-5, 1992b.

NISHIMURA, F. de C. et al. Antioxidant effects of quercetin and naringenin are associated with impaired neutrophil microbicidal activity. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, Oxford, n. 2013, p. 795916, 2013.

NOONAN, D. M. et al. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer metastasis reviews*, Dordrecht, v. 27, p. 31-40, 2008.

O'BRIEN, T. P. Inflammatory Response in the Early Stages of Wound Healing After Excimer Laser Keratectomy. *Archives of ophthalmology*, Chicago, v. 116, n. 11, p. 1470-1474, Nov. 1998.

O'BRIEN, W. J. et al. Expression of NADPH oxidase in rabbit corneal epithelial and stromal cells in culture. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 47, n. 3, p. 853-863, Mar. 2006.

OGAWA, S. et al. Induction of macrophage inflammatory protein-1alpha and vascular endothelial growth factor during inflammatory neovascularization in the mouse cornea. *Angiogenesis*, London, v. 3, n. 4, p. 327-334, 1999.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical reviews in oral biology and medicine*, Boca Raton, v. 9, n. 3e, p. 248-266, 1998.

OLIVEIRA, H. B. et al. VEGF Trap(R1R2) suppresses experimental corneal angiogenesis. *European journal of ophthalmology*, Milano, v. 10, p. 48-54, 2010.

OMOLOLA, R.; AYEPOLA, N. L. B.; OGUNTIBEJU, O. O. Oxidative Stress and Diabetic Complications: The Role of Antioxidant Vitamins and Flavonoids. In: OGUNTIBEJU, O. (Ed.). *Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health*. 2014. Chapter 2.
Available from: <http://www.intechopen.com/books/antioxidant-antidiabetic-agents-and-human-health/oxidative-stress-and-diabetic-complications-the-role-of-antioxidant-vitamins-and-flavonoids> .
Accessed: 12 abr. 2014.

ORMEROD, L. D.; ABELSON, M B.; KENYON, K. R. Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter discs. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 30, p. 2148-2153, Oct. 1989.

OSHIKAWA, J. et al. Novel role of p66Shc in ROS-dependent VEGF signaling and angiogenesis in endothelial cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, Bethesda, v. 302, n. 3, p. H724-732, Feb., 2012.

OZDEMIR, O. et al. Effects of subconjunctivally injected bevacizumab, etanercept, and the combination of both drugs on experimental corneal neovascularization. *Canadian Journal of Ophthalmology*, Montreal, v. 48, n. 2, p. 115-120, 2013.

PAPATHANASSIOU, M. et al. Vascular endothelial growth factor inhibitors for treatment of corneal neovascularization: a meta-analysis. *Cornea*, Philadelphia, v. 32, n. 4, p. 435-444, Apr. 2013.

PARK, C. H. et al. Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, New York, v. 328, n. 1, p. 227-234, Mar. 2005.

PARK, H. Y., KIM, G. Y.; CHOI, Y. H. Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor- κ B and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *International journal of molecular medicine*, Athens, v. 30, n. 1, p.

204-210, Jul. 2012.

PARK, J. S. et al. Anti-inflammatory mechanisms of isoflavone metabolites in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 320, n. 3, p.1237-1245, Mar. 2007.

PATHAK, L.; AGRAWAL, Y.; DHIR, A. Natural polyphenols in the management of major depression. *Expert opinion on investigational drugs*, London, v. 22, n. 7, p. 863-880, Jul. 2013.

PELUSO, I.; RAGUZZINI, A.; SERAFINI, M. Effect of flavonoids on circulating levels of TNF and IL-6 in humans: A systematic review and meta-analysis. *Molecular nutrition & food research*, Weinheim, v. 57, p. 784–801, 2013.

PEPPER, M. S. et al. 8-Prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in Vitro and vivo. *Journal of cellular physiology*, New York, v. 199, p. 98-107, 2004.

PILLAI, R. G. et al. Upregulation of chemokine expression in murine cornea due to mechanical trauma or endotoxin. *The British journal of ophthalmology*, London, v. 92, n. 2, p. 259-264, Feb. 2008.

POLAK, M. et al. Pathophysiology of diabetes complications. *Diabetologia*, Warszawa, v. 40, p. B65-71, 1997.

QAZI, Y.; MADDULA, S.; AMBATI, B. K. Mediators of ocular angiogenesis. *Journal of genetics*, London, v. 88, n. 4, p. 495–515, 2009.

RAMPRASATH, T. et al. Naringenin confers protection against oxidative stress through upregulation of Nrf2 target genes in cardiomyoblast cells. *Journal of physiology and biochemistry*. Pamplona, v. 70, n. 2, p. 407-15, Jun. 2014.

REGENFUSS, B. et al. Corneal (lymph)angiogenesis--from bedside to bench and back: a tribute to Judah Folkman. *Lymphatic research and biology*, Larchmont, v. 6, n. 3-4, p.191-201, 2008.

REN, W. et al. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal research reviews*, New York, v. 23, n. 4, p. 519-534, Jul. 2003.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked. *Free radical biology & medicine*, New York, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v. 20, n. 7, p. 933-56, 1996.

ROERS, A. et al. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *The Journal of experimental medicine*, New York, v. 200, n. 10, p. 1289-1297, Nov. 2004.

ROLLINS, B. J. Chemokines. Review. *Blood*, New York, v. 90, n. 3, p. 909-928, 1997.

RUDOLPH, R.; BALLANTYNE, D. L. Skin grafts. In: MAc CARTHY, J. (Ed.). *Plastic Surgery*. Philadelphia: WB Saunders, 1990. p. 226-274.

RUEGG, C. Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions. *Journal of leukocyte biology*, New York, v. 80, p. 682-684, 2006.

SABARINATHAN, D.; MAHALAKSHMI, P.; VANISHER, A. J. Naringenin, a flavanone inhibits the proliferation of cerebrally implanted C6 glioma cells in rats. *Chemico-biological interactions*,

Amsterdam, v. 189, p. 26–36, 2011.

SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine & growth factor reviews*, Oxford, v. 21, n. 5, p. 331-344, Oct. 2010.

SAIKA, S. et al. Therapeutic effect of topical administration of SN50, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, in treatment of corneal alkali burns in mice. *The American journal of pathology*, New York, v. 166, n. 5, p.1393-1403, May 2005.

SAIKA, S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha. *Cornea*, Philadelphia, v. 26, n. 9, Suppl 1, p. S70-74, Oct. 2007.

SAKIMOTO, T. et al. Anti-inflammatory effect of IL-6 receptor blockade in corneal alkali burn. *Experimental eye research*, London, v. 97, n. 1, p. 98-104, Apr. 2012.

SARI, E. S. et al. Inhibitory effect of sub-conjunctival tocilizumab on alkali burn induced corneal neovascularization in rats. *Current eye research*, London, v. 9, p.1-8, Jun. 2014.

SASAKI E, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*. V. 459, 2009.

SCHAPER, W.; SCHOLZ D. Factors regulating arteriogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Baltimore, v. 23, n. 7, p. 1143-1151, Jul. 2003.

SCHRAMM, A. et al. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascular pharmacology*, New York, v. 56, n. 5-6, p. 216-231, May/June. 2012.

SCHRECK, R.; RIEBER, P.; BAEUERLE, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kB transcription factor and HIV-1. *The EMBO journal*. London, v. 10, n. 8, p. 2247-2258, Aug. 1991.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and non protein bound sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, New York, v. 25, n. 1, p. 192-205, Oct. 1968.

SENER, E. et al. The impact of subconjunctivally injected EGF and VEGF inhibitors on experimental corneal neovascularization in rat model. *Current eye research*, London, v. 36, n. 11, p. 1005-1013, Nov. 2011.

SENGER, D. R. Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor. *Molecular biology of the cell*, Bethesda, v. 21, n. 3, p. 377-379, Feb. 2010.

SHARMA, J.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, Dordrecht, v. 15, n. 6, p. 252-259, Dec. 2007.

SHEN T. et al. Plant extracts of the family lauraceae: a potential resource for chemopreventive agents that activate the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element pathway. *Planta Medica*, Stuttgart, v. 80, p. 5, p. 426-434, Mar. 2014.

SHEN, Y.; ZHANG, W. Y.; CHIOU, G. C. Effect of naringenin on NaIO₃-induced retinal pigment epithelium degeneration and laser-induced choroidal neovascularization in rats. *International journal of ophthalmology*, Xi'an, China, v. 3, n. 1, p. 5-8, 2010.

SHIMIZU, E. et al. Plasma level of interleukin-6 is an indicator for predicting diabetic macular edema. *Japanese journal of ophthalmology*, Tokyo, v. 46, n. 1, p.78-83, Jan./Feb. 2002.

SHONO, T. et al. Involvement of the transcription factor NFκB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Molecular and cellular biology*, Washington, v. 16,

n. 8, p. 4231-4239, 1996.

SHWEIKI, D. et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, London, v. 359, p. 843–845, Oct. 1992.

SIDHU, M. S. et al. Femtosecond laser-assisted selective reduction of neovascularization in rat cornea. *Lasers in medical science*, London, p. 1-11, 2014.

SIMON, D. et al. Soluble gp130, an antagonist of IL-6 transsignaling, is elevated in uveitis aqueous humor. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 49, n. 9, p. 3988-3991, 2008.

SINGH, D. P.; CHOPRA, K. Flavocoxid, dual inhibitor of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase, exhibits neuroprotection in rat model of ischaemic stroke. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, New York, v. 120, p. 33-42, May 2014.

SIVAK, J. M. et al. Pharmacologic uncoupling of angiogenesis and inflammation during initiation of pathological corneal neovascularization. *The Journal of biological chemistry*, Baltimore, v. 286, n. 52, p. 44965-44975, Dec. 2011.

SOTOZONO, C. et al. Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Current eye research*, London, v. 16, n. 7, p. 670-676, Jul. 1997.

SOTOZONO, Chie et al. Effect of Metalloproteinase Inhibitor on Corneal Cytokine Expression after Alkali Injury. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, v. 40, p. 2430-2434, Sep.1999.

STEVENSON, W. et al. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: ranibizumab (Lucentis) vs bevacizumab (Avastin). *The ocular surface*, New York, v. 10, n. 2, p. 67-83, Apr. 2012.

STREILEIN J. W. et al. Anterior chamber-associated immune deviation, ocular immune privilege, and orthotopic corneal allografts. *Transplantation proceedings*, New York, v. 31, n. 3, p. 1472-1475, May 1999

STRISSEL KJ, Rinehart WB, Fini ME: A cornea1 epithelial in- hibitor of stromal cell collagenase synthesis identified as TGF-beta 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:151-162, 1995

SU, W. et al. Doxycycline Enhances the Inhibitory Effects of Bevacizumab on Corneal Neovascularization and Prevents Its Side Effects. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, Mosby, v. 52, n. 12, p. 9108-9115, Nov. 2011.

SUNDERKÖTTER, C. et al. Cellular events associated with inflammatory angiogenesis in the mouse cornea. *The American journal of pathology*, New York, v. 138, n. 4, p. 931-939, Apr. 1991

TANG, L. et al. Splat feature classification with application to retinal hemorrhage detection in fundus images. *IEEE Trans Med Imaging*, New York, v. 32, n. 2, p. 364-375, Feb. 2013.

THOMAS D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free radical biology & medicine*, New York, v. 45, n. 1, p. 18-31, Jul. 2008

TITZE, F. Enzymic method for quantitative determination of Naogram amounts of total an oxidized Glutathione. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 27, n. 3, p. 502-522 Mar. 1969.

UCHIYAMA, M. et al. An ophthalmic solution of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist prevents corneal inflammation in a rat alkali burn model. *Molecular Vision*, Atlanta, v. 19, p. 2135-2150, Nov. 2013.

- UEDA, M. et al. Involvement of prostaglandin E2 in rabbit corneal injury by anterior segment ischaemia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, [New York](#), v. 57, n. 3, p. 285-291, Sep. 1997.
- USHIO-FUKAI, M.; NAKAMURA, Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Letters*, Amsterdam, v. 266, n. 1, p. 37-52, Jul. 2008.
- VALÉRIO, D. A. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. *European journal of pharmacology*, Amsterdam, v. 562, n. 1-2, p. 155-163, May 2007.
- VAN DAM, R. M.; NAIDOO, N.; LANDBERG, R. Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings. *Current opinion in lipidology*, London, v. 24, n. 1, p. 25-33, Feb. 2013.
- VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M. et al. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *The Journal of pathology*, London, v. 232, n. 2, p. 151-164, Jan. 2014.
- VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. *Revista Brasileira Alergia Imunopatologia*, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 146-154, jul./ago. 2001.
- VÁSQUEZ-VIVAR, J. et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 95, n. 16, p. 9220-9225, 1998.
- VASUDEV, N. S.; REYNOLDS, A. R. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, London, v. 17, n. 3, p. 471-494, Jul. 2014.
- VERCELLOTTI, G. M. et al. Hydrogen peroxide alters signal transduction in human endothelial cells. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, New York, v. 117, n. 1, p. 15-24, Jan. 1991.
- VERRI, W. A. et al. IL-15 mediates immune inflammatory hypernociception by triggering a sequential release of IFN-gamma, endothelin, and prostaglandin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 103, n. 25, p. 9721-9725, Jun. 2006.
- VORONOV, E. et al. Unique versus redundant functions of IL-1alpha and IL-1beta in the tumor microenvironment. *Frontiers in immunology*, Lausanne, v. 4, n. 177, Jul. 2013.
- VORONOV, E.; CARMÍ, Y.; APTE, R. N. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Frontiers in physiology*, Lausanne, v. 5, Mar. 2014.
- VU, T. H.; ZENA, W. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & development*, New York, v. 14, n. 17, p. 2123-2133, Sep. 2000.
- WAGONER, M. D. Chemical injuries of eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv Ophthalmol*, Amsterdam, v. 41, p. 275-313, 1997.
- WALLACE, G. R. et al. Serum levels of chemokines correlate with disease activity in patients with retinal vasculitis. *Immunology letters*, Amsterdam v. 90, p. 1, p. 59-64, Nov. 2003.
- WANG, Y. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *Journal of ethnopharmacology*, Lausanne, v. 151, n. 2, p. 944-950, Feb. 2014.
- WHITCHER, J. P. SRINIVASAN, M.; UPADHYAY, M. P. Corneal blindness: a global perspective. *Bulletin of the world health organization*, Genova, v. 79, n. 3, p. 214-221, Jul. 2001.

- WILSON, S. E.; ESPOSITO, A. Focus on molecules. Interleukin-1: a master regulator of the corneal response to injury. *Experimental eye research*, London, 2009; v. 89, n. 2, p.124-125, Aug. 2009.
- WITMER, A. N. et al. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in retinal and eye research*, Oxford, v. 22, n. 1, p. 1-29, Jan. 2003.
- WOLK, K. et al. Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members? *Journal of immunology*, Baltimore, v. 168, n. 11, p. 5397-5402, Jun. 2002.
- XIAO, O. et al. Minocycline Inhibits Alkali Burn-Induced Corneal Neovascularization in Mice. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e41858, July, 2012.
- XU, X. R. et al. Preparation of Naringenin/ β -Cyclodextrin Complex and Its More Potent Alleviative Effect on Choroidal Neovascularization in Rats. *BioMed research international*. New York, Mar. 2014.
- YANG, Y. et al. Chemoprevention of dietary digitoflavone on colitis-associated colon tumorigenesis through inducing Nrf2 signaling pathway and inhibition of inflammation. *Molecular cancer*, London, v. 13, 2014.
- YILMA, A. N. et al. Flavonoid naringenin: a potential immunomodulator for chlamydia trachomatis inflammation mediators. *Mediators of inflammation*, Oxford, maio 2013.
- YOON, K. C. et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea*, Philadelphia, v. 26, n. 4, p. 431-7, maio 2007.
- YOON, S. Y. et al. Subconjunctival injection of low-molecular-weight heparin-taurocholate 7 inhibits corneal neovascularization. *Cornea*, Philadelphia, v. 32, n.11, p. 1488-1492, 2013.
- YOSHIDA, A. et al. Role of NF-kappaB-mediated interleukin-8 expression in intraocular neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*, St. Louis, Mosby , v. 39, n. 7, p. 1097-106, June 1998.
- YOSHIDA, S. et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and cellular biology*, Washington, v. 17, n. 7, p. 4015-4023, July 1997.
- ZHOU, J. et al. Neutrophils promote experimental choroidal neovascularization. *Molecular vision*, Atlanta, v. 11, p. 414-42, 2005.
- ZHOU, W. J. et al. Inhibitory effect of CCR3 signal on alkali-induced corneal neovascularization. *International journal of ophthalmologia*, Xi'an, China, v. 5, n. 3, p. 251-257, 2012.
- ZICHE, M. et al. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circulation research*, Baltimore, v. 80, n. 6, p. 845-852, 1997.

6 ARTIGO

Naringenin eye drops inhibits NaOH induced corneal neovascularization and eye inflammation and oxidative stress in mice

Ana Paula M. T. Oguido^{†*}, Miriam S. N. Hohmann[‡], Felipe A. Pinho-Ribeiro[‡], Jefferson Crespigo[†], Waldiceu A. Verri, Jr. ^{†**}, Antonio M. B Casella^{†**}

[†]Departamento de Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, 86038-440 Londrina, Brazil

[‡]Departamento de Ciências Patológicas - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970 Londrina, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed.

** These authors share senior authorship

ABSTRACT

Naringenin (4', 5, 7-trihydroxyflavanone), abundant in citric fruits like grapefruit, lemon and orange, is a flavanone, a type of flavonoid that has been considered as an antioxidant, anti-inflammatory and anti angiogenic agent playing a role in the prevention of many diseases such as neurodegeneration, atherosclerosis, tumor generation and microbial infections. We investigated the effect of topically administration naringenin on eye in a experimental induced corneal alkali model in mice. Naringenin at the most effective concentration of 10g/L decreased neutrophil and macrophage recruitment, as determined by myeloperoxidase and n-acetyl- β -D glucosaminidase activity, and reduced morphological changes in neovascularization using slit-lamp biomicroscopy, corneal digital photography, and computer-assisted analysis of corneal neovascularization area. Moreover, naringenin inhibited production of cytokines IL-1 β and IL-6 and prevented the down regulation of anti-inflammatory cytokine IL-10. The treatment with naringenin prevented oxidative stress by increasing the levels of reduced glutathione and protein-bound sulphhydryls, and the antioxidant potential in FRAP and ABTS assays. The results indicate that there were anti-inflammatory, antioxidant and anti angiogenic effects with the local use of naringenin in corneal alkali injured model in mice. Therefore, naringenin seems to be a promising active treatment for inflammatory neovascularization.

Neovascularization is a process that leads to formation of new capillary blood vessel as an extension of existing vasculature¹. When present in the eye, is an abnormality responsible for blindness in several eye diseases. It is present in proliferative diabetic retinopathy and age-related macular degeneration, which are the main cause of blindness in adults, and in retinopathy of prematurity, the largest cause of blindness in premature children^{2,3}. The cornea is a tissue with refractive properties and is totally transparent and avascular. The presence of neovascularization in this tissue leads to loss of its transparency and thus is considered the second most important cause of blindness and low visual acuity⁴. Moreover, neovascularization represents one of the main risk factors for rejection in patients undergoing corneal transplantation⁵⁻⁷. During neovascularization, several positive and negative regulators control the cascade of events that contributes to angiogenesis⁸. Among them, inflammation plays an important role in pathological neovascularization in several diseases.

The inflammatory response occurs after tissue injury or infection and leads to recruitment of neutrophils and macrophages that, in turn, can promote angiogenesis⁹ by secreting pro-angiogenic factors such as interleukin IL-1 β and IL-6¹⁰. These mediators increase vascular permeability and facilitate additional recruitment of leukocytes¹¹. Moreover, the new blood vessels generated during neovascularization exhibit increased vascular permeability which also contributes to sustain the inflammatory response. Thus, the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 represents an important step that controls inflammation and, consequently, the pathological neovascularization. In fact, several diseases have been associated to lower levels of this cytokine¹².

Oxidative stress increases during inflammation and has also an important role in angiogenesis¹³. Studies show that oxidative stress is involved in pathways that lead to neovascularization^{11,14}, by inducing the migration of endothelial cells as occurs on angiogenic answers in tumor growth^{15,16}. Additionally, reactive oxygen species (ROS), which are considered one of the culprits of oxidative stress, can activate both nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and NLRP3 inflammasome, inducing the expression and maturation of IL-1 β , respectively. Through these pathways, many inflammatory and pro-angiogenic mediators are produced, including IL-6¹².

Naringenin (**1**) is 4', 5, 7-trihydroxyflavanone, a flavanone found abundantly in vegetables and citrus fruits that exhibits several protective effects^{17,18}. It had been demonstrated that **1** inhibits myeloperoxidase activity, an enzyme secreted by activated neutrophils¹⁹, downregulates NF- κ B activity, and reduces the production of NF- κ B-related cytokines such as IL-1 β and IL-6^{20,21}. Furthermore, **1** reduces neutrophil-derived ROS and also enhances ROS detoxification by triggering the synthesis of reduced glutathione, the most abundant non-enzymatic antioxidant in cells²⁰. In the eye, **1** inhibited choroidal neovascularization^{22,23}.

Several therapeutic options are currently available to treat corneal neovascularization like corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops and photocoagulation, all with limited efficiency and harmful side effects^{24,25}. Expectations are that combined inhibition of different pathways may lead to better treatments for corneal neovascularization²⁶. In this sense, flavonoids have been considered promising candidates for a new category of anti-inflammatory drugs.

Motivated by the pressing need for improved treatment options, and considering the emerging literature reporting the protective effects of **1** in choroidal neovascularization^{22,23}, we investigated the protective effects of naringenin eye drops in alkali (NaOH)-induced corneal neovascularization in mice, as well as its effects on the inflammation and oxidative stress present in this model.

RESULTS AND DISCUSSION

Naringenin (1) Reduces Myeloperoxidase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase Activity in the Cornea

of Mice with NaOH-induced neovascularization. Several lines of evidence indicate that infiltrating leukocytes play a crucial role in the development of neovascularization in different ocular tissues²⁷⁻²⁹.

In this sense, the effect of daily treatment with **1** eye drops (0.08, 0.8, 8 and 80 μ g) on NaOH corneal injury-induced leukocyte recruitment was investigated (detailed in the experimental protocol of the experimental section). In the present study we assessed the leukocyte recruitment to the cornea by measuring the activity of myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG). MPO is an enzyme mainly found in cytoplasmic granules of neutrophils, but also monocytes. NAG, on the other hand, is a lysosomal enzyme present in high levels in activated macrophages. Together, MPO and NAG serve as good markers of neutrophil and macrophage infiltration in tissues, respectively, and inflammation^{30,31}. NaOH (1N) significantly increased MPO and NAG activity in the cornea when compared to saline 3 (Figure 1A and B) and 7 days (Figure 1C and D) after corneal injury. Treatment with **1** (80 μ g) alone did not present significant difference the activity of the enzymes with cornea control (Figure 1A-D) of mice without NaOH corneal injury. Only the doses of 8 and 80 μ g of **1** inhibited the increase in MPO activity 3 and 7 days after NaOH injury (Figure 1A and C). NAG activity was reduced by 0.8 - 80 μ g of **1** 3 and 7 days after NaOH injury (Figure 1B and D). The highest dose of **1** in reducing MPO and NAG activity in both time periods assessed (3 and 7 days) was 80 μ g, thus this dose was chosen for the following experiments of the study. The results indicate that daily treatment with **1** eye drops can inhibit both neutrophil and macrophage recruitment to the cornea in this model of corneal neovascularization. This may be an important anti-angiogenic mechanism of **1**, since accumulating evidence indicates that infiltrating inflammatory cells possess direct angiogenic ability. In corneal and choroidal neovascularization, studies have shown that infiltrating neutrophils and macrophages can induce neovascularization^{27,28}. In fact, studies show that the inhibition of neutrophil and macrophage recruitment, results in diminished neovascularization in the cornea and choroidea²⁷.

Thus, it was investigated in the next set of experiments if the inhibition of neutrophil and macrophage recruitment by **1** would also result in reduced neovascularization in the cornea.

Naringenin (1) Reduces corneal neovascularization induced by NaOH injury. To investigate if daily treatment with **1** eye drops would reduce or inhibit corneal neovascularization, biomicroscopic images of the corneas were obtained and the area of neovascularization in the cornea was determined 3 and 7 days after NaOH-induced corneal injury. NaOH induced significant increase in the area of neovascularization in the cornea 3 and 7 days (Figure 2), which was reduced significantly by daily treatment with **1** (80 µg) 3 and 7 days after NaOH injury was induced. **1** (80 µg) alone compared with control group did not induce neovascularization in the cornea (Figure 2). These results evidence the ability of **1** (80µg) to reduce neovascularization in the cornea. This finding is in agreement with previous studies that have demonstrated that **1** prevents the formation of laser-induced neovascularization in the choroidea^{22,23}. Confirming the antioangiogenic activity of **1**, in an Ehrlich ascites carcinoma tumor model, the protective effect of **1** was attributed to its ability to inhibit angiogenesis³².

Neovascularization in the cornea occurs as a result of the disequilibrium between angiogenic and antiangiogenic stimulus³³. During and after corneal injury, corneal epithelial and stromal cells and leukocytes recruited into the injured cornea release a series of factors, such cytokines (IL-1β, TNF-α, TGF-β, among others) and growth factors (VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF))^{28,33}, shifting the balance towards angiogenesis and neovascularization formation^{34,35}. Among these many factors, cytokines seem play an important role in inducing both inflammation and neovascularization^{1,12,35,36}. In this context, the effect of **1** on cytokine production induced by NaOH corneal injury was assessed.

Naringenin (1) reduces IL-1β and IL-6 and increases IL-10 production in the cornea of mice with NaOH-induced neovascularization. The effect of daily treatment with **1** (80µg) on the levels of IL-1β, IL-6, and IL-10 in the cornea of mice with NaOH-induced neovascularization was assessed. Treatment

with **1** (80 μ g) alone did not increase IL-1 β and IL-6 or reduce IL-10 levels, compared with control group in the cornea of mice without NaOH corneal injury. NaOH significantly increased IL-1 β (Figure 3A, D, and G) and IL-6 (Figure 3B, E, and H) levels in the cornea 2, 4, and 6 h, compared with control group, after cornea alkali injury. Also, NaOH reduced IL-10 levels (Figures 3C, F, I) in the cornea 2 and 6 h, but not 4 h, after cornea alkali injury. Treatment with **1** eye drops (80 μ g) reduced the increase in the levels of IL-1 β and IL-6 at all time points assessed and prevented IL-10 reduction only at 6 h (Figure 3I). The reduction in pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 by **1** is consistent with previous studies that also observed that this compound can prevent cytokine production induced by inflammatory stimulus^{19,21}.

Studies have shown that IL-1 β and IL-6 are important in the induction of neovascularization in the cornea and inhibition in their production can reduce neovascularization in the cornea^{35,37}. Cytokines, among them IL-1 β and IL-6, can induce the expression of VEGF, which in turn induces angiogenesis^{7,9,12}. Thus, the modulatory effect of **1** on pro-inflammatory cytokine production may be important in the inhibition of neovascularization in the cornea.

Although IL-10 is an immune-modulatory cytokine that can suppress the production of pro-inflammatory cytokines³⁸, in the present study **1** prevented the depletion in IL-10 levels only 6 h after NaOH injury (Figure 3I), thus the reduction in IL- β and IL-6 levels does not seem to be dependent on IL-10 modulation, at least not in the first time point assessed (2 h) (Figure 3A-C). The reduction in IL-1 β and IL-6 levels by **1** may be attributed to the reduction in neutrophil and macrophage recruitment, since these cells are the main source of pro-angiogenic and inflammatory cytokines in corneal and choroidal neovascularization^{28,29}. Also, because pro-inflammatory cytokines further stimulate leukocyte recruitment and activation, the reduction in cytokine production may also contribute to the reduced leukocyte recruitment into the cornea of **1** treated mice (Figure 1).

In addition to leukocyte recruitment and the production of cytokines by these cells (Figure 1), another mechanism that seems to play important role in corneal neovascularization is oxidative stress^{11,36}. In this sense, in the following experiments, the effect of **1** on oxidative stress induced by

NaOH injury was investigated.

Naringenin (1) eye drops prevents the alkali-induced decrease of antioxidant capacity in the cornea of mice. Oxidative stress has been proposed to play an important role in the pathogenesis of inflammatory corneal disease and is related to neutrophil infiltration within the inflamed cornea. Concentrations of endogenous antioxidants were decreased significantly in inflammatory neovascularization cornea experimental model¹³.

To measure the antioxidant capacity in the cornea related to electron transfer, the ABTS (radical cation scavenging) and FRAP (ferric reducing ability) assays were chosen. Both tests evaluate the total antioxidant capacity in the samples and present a strong correlation between each other, because the redox potential similar³⁹. Corroborating this observation, a correlation between the FRAP and ABTS assays in cornea samples was reported herein (Figure 4). NaOH reduced the antioxidant capacity ABTS radical cation scavenging, of cornea tissue 2, 4, 6 h (Figure 4A, C and E), while reduced the ferric reducing potential of cornea tissue 4 and 6 h (Figure 4B, D and F). The **1**-treated group showed a significant increase in antioxidant activity, by ABTS scavenging, when compared to the cornea control group (Figure 4A,C and E). However, this prevention of antioxidant decrease, by ferric reducing potential of cornea tissue was not observed in the eye drops of **1**, in 2 hours measure, by FRAP assay.

The reduced glutathione (GSH) is the most abundant cellular antioxidant molecule and plays important roles in cell integrity. Therefore, the effect of eye drops **1** on the corneal GSH levels was evaluated using the treatment protocol shown in experimental section. The general redox status was also evaluated by measuring protein-bound sulfhydryl (SH) groups. The samples of corneal injured by alkali from control group showed significant reduction in GSH levels at 2, 4, and 6 h after stimulus compared to the negative control group (experimental section) (Figure 5A, C and E). The mechanism by which GSH quenches radicals is related to its ability to transfer a hydrogen atom. In Figure 5 treatment with **1**-80 μ g significantly prevented GSH depletion induced by alkali (Figure 5A, C and E),

preserving the tissue from oxidative damage that characterizes neovascularization cornea. The treatment with eye drops showed to prevent GSH depletion, there was statistical difference compared to the cornea control group (Figure 5A, C and E). The treatment with **1** also improved antioxidant status of samples, suggesting that antioxidant enzymes (protein-bound sulphhydryls) may contribute to its protective effects during oxidative stress (Figure 5B, D and F).

The recruitment and activation of neutrophils during acute inflammation contribute to the overproduction of reactive oxygen and nitrogen species that overwhelms the tissue antioxidant protective mechanisms, resulting oxidative stress, which perpetuates inflammation of the cornea⁴⁰. Furthermore, it was demonstrated that neutrophils depleted of ROS display reduced chemotaxis, indicating that ROS are essential factors modulating neutrophil recruitment⁴¹. Thus, a rapid inhibition of free radical generation could have contributed to a lower level of neutrophil infiltration into the inflamed tissue, thus preventing cornea tissue from inflammatory cellular infiltration.

Treatment with eye drops of **1** was able to prevent the inflammatory process in the experimental cornea model used here. This report showed a significant reduction in neutrophil and macrophage recruitment (MPO and NAG activity), and biomicroscopical damage scores in the cornea when compared to control group. Furthermore, this treatment also down-regulated the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6, prevented the anti-inflammatory cytokine IL-10 reduction, and preserved the endogenous antioxidant levels in the cornea of mice with NaOH injury.

These protective effects and mechanisms had not been reported by the treatment with flavonoid naringenin in this model of neovascularization. Thus, the therapeutic effects of eye drop naringenin in experimental model must be considered a promising active treatment for inflammatory neovascularization cornea. In summary, the present study showed that eye drops with **1** reduced the inflammation in the cornea in alkali-induced neovascularization model by a mechanism dependent on inhibition of pro-inflammatory cytokine production and the preservation of antioxidant defenses and the anti-inflammatory cytokine IL-10, resulting in reduced neovascularization. Therefore, it is envisaged that this novel formulation containing **1** merits further preclinical and clinical investigation

on its applicability in inflammatory neovascularization corneal disease. Conceptually, this study also raises the importance of flavonoids in pharmaceutical development.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. The following materials were obtained from the sources indicated: naringenin (**1**) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in isotonic solution (NaCl 0.9%) immediately before eye drop administration to 0.01-10g/L concentrations. NaCl 0.9% (Fresenius Kabi Brasil Ltda. Aquiraz, CE, Brazil), NaOH (Universidade Estadual de Londrina, Brazil), ketamine (Ketalar -Pfizer, Brazil), xylazine (Virbaxyl-Virbac, Brazil), hydrochloride propacaina 0.5% (Anestalcon-Alcon, Brazil).

Animals. 572 Male Swiss mice (20-25g) were obtained from the Central Vivarium of Universidade Estadual de Londrina (UEL) and were kept at the Animal facilities of the Department of Health Sciences of UEL for at least 2 days before the experiments. Mice were housed in propylene cages (300x195x130 mm) with metal cover, in a temperature-controlled room (21 °C) under a light/dark cycle of 12:12 h, with free access to food and water. The maximum number of mice was of five mice/per cage (area of 585 mm²). This study was approved the Research and Ethics Committee of UEL (process 013/2013) and the animals were handled according to guidelines.

Experimental Protocol.

Corneal neovascularization in the right eye of mice was induced by alkaline solution (NaOH, 1N) as previously described⁴². The animals number was 6 per group. First, mice were anesthetized by intraperitoneal injection with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and topical ocular anesthesia was induced by hydrochloride propacain 0.5%. The group control negative was treated only vehicle (saline) instilled for 10 days. Another group was treated only with **1** (80µg)eye drop instilled for 10 days. Groups treatments was injured with 2 mm diameter filter paper disc uniformly soaked with NaOH, 1N solution applied to the cornea of the right eye for 10s, then irrigated with 20

ml of 0.9% saline solution and finally, the epithelia was mechanically scrapped. The right NaOH-injured eye of mice were treated twice a day with 0.08, 0.8, 8 and 80 μg of **1** (8 μL of 0.01-10 g/L suspension) or vehicle (saline). Daily treatment with **1** or saline started 3 days before the stimulus with NaOH solution (1N) and continued up until 7 days, when the animals were euthanized and of the right eyes were collected for testing. The best dose of **1** was determined by assessing leukocyte recruitment to the cornea myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity assays, 3 and 7 d after NaOH (1N) stimulus, and by significant inhibited area of neovascularization in the cornea, determined by biomicroscopic images, and analysed by digital program and NaOH-induced corneal neovascularization was assessed 3 and 7 days also. Cytokine (IL-1 β , IL-6, and IL-10) levels in the eye tissue were determined 2, 4 and 6 h after NaOH (1N) stimulus. Oxidative stress was assessed by determining the ferric reducing antioxidant power (FRAP), ability to scavenge 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzothiazoline 6-Sulfonic acid) (ABTS) and the levels of reduced glutathione (GSH) and protein sulphhydryls in the cornea 2, 4, and 6 h after NaOH injury.

MPO activity assay. The neutrophil recruitment to the corneal tissue was evaluated by an adapted MPO kinetic-colorimetric assay⁴³. Samples were collected in 200 μL of 50 mM K_2HPO_4 buffer (pH 6.0) containing 0.5% of Hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), and homogenized using Tissue-Tearor (Biospec®). After that, homogenates were centrifuged at 16100 g for 2 min at 4 °C. The supernatant was collected. Briefly, 50 μL of supernatant was mixed with 200 μL of 0.05 M K_2HPO_4 buffer (pH 6.0), containing 0.0167% *o*-dianisidine dihydrochloride and 0.05% hydrogen peroxide. The absorbance was determined after 5 min at 450 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland). The MPO activity of samples was compared to a standard curve of neutrophils and presented as MPO activity (number of neutrophils $\times 10^3$ /mg of tissue).

NAG activity assay. NAG activity was determined by an adapted colorimetric method previously described⁴⁴ and used as indirect marker of macrophage recruitment. Briefly, 40 μL of supernatant,

obtained in MPO activity assay, was placed in a 96-well plate, followed by the addition of 80 μ L of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0). The reaction was initiated by the addition of 2.24 mM 4-nitrophenyl N-acetyl-l-glucosaminide. The plate was incubated at 37°C and initiated by adding glycine buffer (pH 10.6). The enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 400 nm (Multiskan GO ThermoScientific). NAG activity of samples was compared with a standard curve of macrophages and presented as NAG activity (number of macrophages $\times 10^3$ /mg of tissue).

Corneal neovascularization assessment. Biomicroscopic images of the corneas were obtained and the area of neovascularization was assessed in the cornea was determined 3 and 7 days after NaOH-induced corneal injury. Clinical evaluation through digital photography biomicroscopy. Mice were submitted to clinical assessment of neovascularization using the digital photographic record by biomicroscope. The area of neovascularization and analysis of corneal image was performed using biomicroscopy (HS 5000 video system – Huvitz), and analyzed by program ImageJ1.45x (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Java 1.6.0_02)3 and 7 days after NaOH injury.

Cytokine measurement. The corneal tissue samples were homogenized in 1 mL of saline. Concentrations of TNF- α , IL-1b, IL-6, and IL-10 levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Ready-SET-Go! (eBioscience, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's specifications. The results were obtained by comparing the optical density of samples at 450 nm (Multiskan GO ThermoScientific) with standard curves and expressed as picograms (pg) of cytokine per mg of tissue.

ABTS and FRAP assays. The ability of samples to resist oxidative damage was determined as free radical scavenging ability (ABTS assay) and ferric reducing ability (FRAP assay). The tests were adapted to a 96-well microplate format from previously described assays⁴⁵. Corneal tissue was homogenized with 500 μ L of 1.15% KCl. The homogenates were centrifuged (10 min $\times 200 g$ 004 °C) and the

supernatants were used in both assays. For ABTS assay, ABTS solution was diluted with phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) to an absorbance of 0.80 at 730 nm. 200 μ L of diluted ABTS solution were then mixed to 10 μ L of sample and 40 μ L of H₂O Milli Q plus in each well. After 6 min of incubation at 25 °C, the absorbance was measured at 730 nm. For FRAP assay, 20 μ L of supernatant was mixed with and 30 μ L of H₂O Milli Q plus and 150 μ L of FRAP reagent freshly prepared. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min and the absorbance was measured at 595 nm. The results of ABTS and FRAP assays were equated against a Trolox standard curve (0.02–20 nmol). The results are expressed as nmol of Trolox equivalents per mg of protein in both assays.

GSH and protein-bound SH levels assay. The levels of GSH in the corneal tissue were determined using a spectrophotometric method⁴⁴. Samples were homogenized using Tissue-Tearor (Biospec®) 200 μ L of EDTA 0.02 M. Aliquots of 50 μ L were used in protein-bound SH assay. For GSH assay, homogenates were treated with 25 μ L of trichloroacetic acid 50%. After 15 min, the homogenates were centrifuged at 1500 *g* for 15 min. Both the homogenate (aliquots) and supernatant were used in the next steps, where 50 μ L of each sample was added to a solution containing 200 μ L Tris 0.4M (pH 8.9) plus 10 μ L of DTNB. After 5 min, the measurements were performed in 412 nm against a blank control [UV - vis spectrophotometer (UV-1650, SHIMADZU)]. The results were presented as nmol of GSH or PSH per mg of protein

Data analyses. Results are presented as means \pm SEM ($n = 5, 6$); each experiment was performed at least twice. Two-way ANOVA was used to compare the groups and doses at all times when the parameters were measured at different times after the stimulus injection. The analyzed factors were treatments, time and time versus treatment interaction. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests was performed for each time. All statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 5 (La Jolla, CA). The level of significance was set at $p < 0.05$.

Figure captions

Figure 1. Naringenin (**1**) reduces neutrophil and macrophage recruitment to the cornea induced by NaOH corneal injury. Neutrophil and macrophage recruitment to the cornea was determined by assessing myeloperoxidase (MPO) (Panel A and C) and N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) (Panel B and D) activity, respectively, 3 and 7 days after NaOH injury. Results are provided as means \pm SEM of five mice per group per experiment and are representative of two separate experiments [$*p < 0.05$ compared to the saline group (negative control); $\#p < 0.05$ compared to vehicle treated group with NaOH corneal injury; $**p < 0.01$ compared to vehicle treated group with NaOH corneal injury; $##p < 0.001$ compared to vehicle treated group with NaOH corneal injury. One-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test].

Figure 2. Naringenin (**1**) reduces neovascularization in the cornea induced by NaOH corneal injury. Representative digital images of the cornea were obtained by biomicroscopy (Panel A: negative control cornea 3 (a) and 7 days (a1); NaOH-induced corneal injury treated with vehicle 3 (b) and 7 days (b1); NaOH-induced corneal injury treated with 0.08 (c and c1), 0.8 (d and d1), 8 (e and e1), or 80 μ g (f and f1) of **1**, 3 and 7 days after stimulus, respectively; and **1** (80 μ g) control group 3 (g) and 7 days (g1). The area of neovascularization in the cornea was determined (Panel B and C, 3 and 7 days after NaOH-induced corneal injury, respectively). Results are provided as means \pm SEM of five mice per group per experiment and are representative of two separate experiments [*p < 0.05 compared to the saline group (negative control); #p < 0.05 compared to vehicle treated group with NaOH-induced corneal injury. One-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test].

Figure 3. Naringenin (**1**) modulates cytokine production in the cornea induced by NaOH corneal injury. The levels of IL-1 β (Panels A, D, and G), IL-6 (Panels B, E, and H), and IL-10 (Panels C, F, and I) was determined in the corneal tissue 2, 4, and 6 h after NaOH-induced corneal injury. Results are provided as means \pm SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments [$*p < 0.05$ compared to the saline group (negative control); $\#p < 0.05$ compared to vehicle treated group with NaOH-induced corneal injury. One-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test].

Figure 4. Naringenin (**1**) inhibits the depletion in total antioxidant capacity in the cornea induced by NaOH corneal injury. Total antioxidant capacity was assessed by determining the ability to scavenge 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzothiazoline 6-Sulfonic acid (ABTS) (Panel A, C, and E) and Ferric Reducing Potential (FRAP) (Panel B, D, and F) of the corneal tissue 2, 4, and 6 h after NaOH-induced corneal injury. Results are provided as means \pm SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments [$*p < 0.05$ compared to the saline group (negative control); $\#p < 0.05$ compared to vehicle treated group with NaOH-induced corneal injury. One-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test].

Figure 5. Naringenin (**1**) inhibits the depletion in reduced glutathione and protein sulphydryl levels in the cornea induced by NaOH corneal injury. The levels of reduced glutathione (GSH) (Panel A, C, and E) and protein sulphydryl (Protein SH) (Panel B, D, and F) in the corneal tissue was determined 2, 4, and 6 h after NaOH-induced corneal injury. Results are provided as means \pm SEM of six mice per group per experiment and are representative of two separate experiments [$*p < 0.05$ compared to the saline group (negative control); $\#p < 0.05$ compared to vehicle treated group with NaOH-induced corneal injury. One-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test].

REFERENCES

- (1) Folkman, J. N. *Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182–1186.
- (2) Penn, J. S.; Madan, A.; Caldwell, R. B.; Bartoli, M.; Caldwell, R. W.; Hartnett, M. E. *Prog. Retin. Eye Res.* **2008**, *27*, 331–371.
- (3) Dace, D. S.; Khan, A. A.; Kelly, J.; Apte, R. S. *PLoS One* **2008**, *3*, e3381.
- (4) Whitcher, J. P.; Srinivasan, M.; Upadhyay, M. P. **2001**.
- (5) Maguire, M. G.; Stark, W. J.; Gottsch, J. D.; Stulting, R. D.; Sugar, A.; Fink, N. E.; Schwartz, A. *Ophthalmology* **1994**, *101*, 1536–1547.
- (6) Dana, M. R.; Streilein, J. W. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1996**, *37*, 2485–2494.
- (7) Azar, D. T. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **2006**, *104*, 264–302.
- (8) Ferrara, N.; Kerbel, R. S. *Nature* **2005**, *438*, 967–974.
- (9) Noonan, D. M.; De Lerma Barbaro, A.; Vannini, N.; Mortara, L.; Albin, A. *Cancer Metastasis Rev.* **2008**, *27*, 31–40.
- (10) Feiken, E.; Rømer, J.; Eriksen, J.; Lund, L. R. *J. Invest. Dermatol.* **1995**, *105*, 120–123.
- (11) Grivennikov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M. *Cell* **2010**, *140*, 883–899.
- (12) Naldini, A.; Leali, D.; Pucci, A.; Morena, E.; Carraro, F.; Nico, B.; Ribatti, D.; Presta, M. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 4267–4270.
- (13) Abdelkawi, S. A.; Hassan, A. A. *Gen. Physiol. Biophys.* **2012**, *31*, 449–455.
- (14) Kubota, M.; Shimmura, S.; Kubota, S.; Miyashita, H.; Kato, N.; Noda, K.; Ozawa, Y.; Usui, T.; Ishida, S.; Umezawa, K.; Kurihara, T.; Tsubota, K. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 427–433.
- (15) Oshikawa, J.; Kim, S.-J.; Furuta, E.; Caliceti, C.; Chen, G.-F.; McKinney, R. D.; Kuhr, F.; Levitan, I.; Fukai, T.; Ushio-Fukai, M. Novel role of p66Shc in ROS-dependent VEGF signaling and angiogenesis in endothelial cells. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 2012, *302*, H724–H732.
- (16) Ushio-Fukai, M.; Nakamura, Y. *Cancer Lett* **2008**, *266*, 37–52.
- (17) Ruh, M. F.; Zacharewski, T.; Connor, K.; Howell, J.; Chen, I.; Safe, S. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 1485–1493.
- (18) Cook, N. C.; Samman, S. *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 66–76.
- (19) Nishimura, F. D. C. Y.; De Almeida, A. C.; Ratti, B. A.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C. V.; Ximenes, V. F.; De Oliveira Silva, S. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*.
- (20) Ramprasath, T.; Senthamizharasi, M.; Vasudevan, V.; Sasikumar, S.; Yuvaraj, S.; Selvam, G. S. *J. Physiol. Biochem.* **2014**, *70*, 407–415.
- (21) Yilma, A. N.; Singh, S. R.; Morici, L.; Dennis, V. A. *Mediators Inflamm.* **2013**, *2013*.
- (22) Xu, X.; Yu, H.; Hang, L.; Shao, Y.; Ding, S.; Yang, X. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 623509.
- (23) Shen, Y.; Zhang, W. Y.; Chiou, G. C. *Int. J. Ophthalmol.* **2010**, *3*, 5–8.
- (24) Gonzalez, L.; Loza, R. J.; Han, K.-Y.; Sunoqrot, S.; Cunningham, C.; Purta, P.; Drake, J.; Jain, S.; Hong, S.; Chang, J.-H. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2013**, *29*, 124–134.
- (25) Chang, J. H.; Gabison, E. E.; Kato, T.; Azar, D. T. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2001**, *12*, 242–249.
- (26) Chang, J. H.; Garg, N. K.; Lunde, E.; Han, K. Y.; Jain, S.; Azar, D. T. Corneal Neovascularization: An Anti-VEGF Therapy Review. *Survey of Ophthalmology*, **2012**, *57*, 415–429.
- (27) Moromizato, Y.; Stechschulte, S.; Miyamoto, K.; Murata, T.; Tsujikawa, A.; Jousseaume, A. M.; Adamis, A. P. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 1277–1281.
- (28) Liu, G.; Lu, P.; Li, L.; Jin, H.; He, X.; Mukaida, N.; Zhang, X. *Mol. Vis.* **2011**, *17*, 2129–2138.
- (29) Amano, S.; Rohan, R.; Kuroki, M.; Tolentino, M.; Adamis, A. P. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1998**, *39*, 18–22.
- (30) Horinouchi, C. D.; Mendes, D. A.; Soley Bda, S.; Pietrovski, E. F.; Facundo, V. A.; Santos, A. R.; Cabrini, D. A.; Otuki, M. F. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *145*, 311–319.

- (31) Casagrande, R.; Georgetti, S. R.; Verri Jr., W. A.; Jabor, J. R.; Santos, A. C.; Fonseca, M. J. *AAPS PharmSciTech.* **2006**, *7*, E10.
- (32) Anand, K.; Sarkar, A.; Kumar, A.; Ambasta, R. K.; Kumar, P. *Nutr. Cancer.* **2012**, *64*, 714–724.
- (33) Shakiba, Y.; Mansouri, K.; Arshadi, D.; Rezaei, N. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **2009**, *3*, 221–231.
- (34) Ambati, B. K.; Nozaki, M.; Singh, N.; Takeda, A.; Jani, P. D.; Suthar, T.; Albuquerque, R. J. C.; Richter, E.; Sakurai, E.; Newcomb, M. T.; Kleinman, M. E.; Caldwell, R. B.; Lin, Q.; Ogura, Y.; Orecchia, A.; Samuelson, D. A.; Agnew, D. W.; St Leger, J.; Green, W. R.; Mahasreshti, P. J.; Curiel, D. T.; Kwan, D.; Marsh, H.; Ikeda, S.; Leiper, L. J.; Collinson, J. M.; Bogdanovich, S.; Khurana, T. S.; Shibuya, M.; Baldwin, M. E.; Ferrara, N.; Gerber, H.-P.; De Falco, S.; Witta, J.; Baffi, J. Z.; Raisler, B. J.; Ambati, J. *Nature* **2006**, *443*, 993–997.
- (35) Xiao, O.; Xie, Z. Lian; Lin, B. Wu; Yin, X. Fang; Pi, R. Biao; Zhou, S. You. *PLoS One* **2012**, *7*.
- (36) Coussens, L. M.; Werb, Z. *Nature* **2006**, *420*, 860–867.
- (37) Kim, J. W.; Chung, S. K. *Cornea* **2013**, *32*, 185–190.
- (38) Cunha, T. M.; Verri Jr., W. A.; Silva, J. S.; Poole, S.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, *102*, 1755–1760.
- (39) Katalinic, A.; Bartel, C.; Uhlenkamp, T.; Raspe, H. *Gesundheitswesen* **1999**, *61*, 436–438.
- (40) Leal, S.M.; Vareechon, C.; Cowden, S.; Cobb, B.A.; Latgé, J.P.; Momany, M.; Pearlman, E.J. *Clin Invest.* **2012**, *122*, 2482–98.
- (41) Hattori, H.; Subramanian, K. K.; Sakai, J.; Jia, Y.; Li, Y.; Porter, T. F.; Loison, F.; Sarraj, B.; Kasorn, A.; Jo, H.; Blanchard, C.; Zirkle, D.; McDonald, D.; Pai, S. Y.; Serhan, C. N.; Luo, H. R. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* **2010**, *107*, 3546–3551.
- (42) Yang, L.-L.; Zhou, Q.-J.; Wang, Y.; Gao, Y.; Wang, Y.-Q. *Int. J. Ophthalmol.* **2012**, *5*, 32–37.
- (43) Casagrande, R.; Georgetti, S. R.; Verri Jr., W. A.; Dorta, D. J.; dos Santos, A. C.; Fonseca, M. J. *J. Photochem. Photobiol. B* **2006**, *84*, 21–27.
- (44) Hohmann, M. S. N.; Cardoso, R. D. R.; Pinho-Ribeiro, F. A.; Crespigio, J.; Cunha, T. M.; Alves-Filho, J.; C.; da Silva, R. V.; Pinge-Filho, P.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q.; Casagrande, R.; Verri, W. A. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, 13.
- (45) Katalinic, V.; Modun, D.; Music, I.; Boban, M. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2005**, *140*, 47–52.

7 CONCLUSÕES

Neste modelo de indução da NV corneana induzida pelo NaOH, a inflamação corneana foi demonstrada através da infiltração de neutrófilos e macrófagos pela análise dos marcadores MPO e NAG; e pela presença da expressão elevada das citocinas IL-1 β , IL-6 de forma significativa. O estresse oxidativo foi demonstrado através da redução da capacidade do poder de redução do ferro (FRAP) e pela redução da capacidade sequestradora do ABTS, além da depleção de antioxidantes GSH e PSH, nesse modelo de injúria pelo NaOH.

A instilação tópica ocular da suspensão da naringenina dos camundongos inibiu a infiltração de neutrófilos e macrófagos, demonstrados através dos marcadores MPO e NAG de forma significativa. Esta inibição demonstrou característica dose dependente, no terceiro e sétimo dia de tratamento, no modelo de NV induzida por álcali.

O tratamento com a suspensão naringenina instilada topicamente inibiu a formação de neovasos corneanos no modelo experimental de NV na córnea induzida por álcali em olhos de camundongos, demonstrados nas análises das imagens digitais pelo programa Imagej.

A instilação tópica ocular da suspensão da naringenina inibiu de forma significativa, a presença de citocinas IL-1 β , IL-6, após o estímulo da injúria por álcali, nas medidas realizadas 2, 4 e 6 horas após o estímulo. Em contra partida a IL-10, anti-inflamatória, apresentou-se elevada de forma significativa na hora 6, após tratamento

A instilação tópica ocular da suspensão da naringenina preveniu de forma significativa, a capacidade antioxidante demonstrados pelos ensaios de FRAP e capacidade sequestradora do ABTS, e preveniu a depleção do antioxidante GSH.

ANEXOS

ANEXO A



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 013/2013

Londrina, 21 de Janeiro de 2013.

Prezado Professor,

A CEUA/UEL reunida em 11 de Dezembro de 2012 avaliou o protocolo de projeto de pesquisa intitulado "Estudo experimental da inibição da neovascularização corneana induzida por álcali em camundongos", processo CEUA nº 31707.2012.85, o projeto foi **aprovado para execução** entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão resolvidos.

Serão utilizados 90 camundongos Swiss, com idade de 40 a 45 dias e peso de 20 a 25g, provenientes do Biotério Central da UEL. O projeto tem o objetivo de avaliar se o tratamento com colírio da naringenina reduz o processo inflamatório, se inibe a neovascularização inflamatória, se inibe a nocicepção e o estresse oxidativo no modelo experimental de neovascularização da córnea induzida por álcali nos olhos dos camundongos. Para isto os camundongos serão submetidos ao modelo de inflamação induzida por álcali no olho direito, e serão tratados com a naringenina para avaliar seu efeito na inflamação e estresse. Após o estímulo corneano e tratamento os animais serão avaliados quanto a nocicepção nos tempos 2, 4, 6, 12 e 24 horas após o estímulo pela contagem do número de piscadas por minuto. As avaliações da atividade da mieloperoxidase será realizada 3 e 7 dias após a indução do modelo. A avaliação da produção de citocinas, avaliação do estresse oxidativo, da capacidade antioxidante total, da quantificação da Glutafina reduzida, análise de Quimiluminescência induzida por t-butilhidroparóxina e histologia serão realizadas no 7º dia de tratamento. Os experimentos estão previstos para execução em 12 meses após a aprovação pela CEUA-UEL.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Waldiceu Ap. Verri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Antônio Marcelo Barbante Casella

Coordenador do Projeto

Departamento de Cirurgia/Oftalmologia

Centro de Ciências da Saúde

Com cópia para Sra. Egle Maria da Sousa (Chefe da DCA/PROPPC), Prof. Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL) e Diretora do Centro de Ciências da Saúde

ANEXO B

1



Preparation and Submission of Manuscripts

(Revised May 2014)

Contents (click on the topic)

Preparation and Submission of Manuscripts – Title Page – Abstract – Introduction – Results and Discussion – Experimental Section – Acknowledgments – References – Nomenclature – Abbreviations – Graphics – Chemical Structures – Tables – Figures – Table of Contents Graphic

Recommendations for Crystal Structure Papers – Published Manuscript – Reviewer's Material | **Supporting Information** | **Journal Publishing Agreement** | **Author List** | **Professional Ethics** | **Manuscript Submission** – Web Submission – General File Preparation – Currently Acceptable Word Processing Packages | **ACS Policies for E-prints and Reprints** | **Galley Proofs** | **Corrections**

Title Page

The title should appear on a separate page and should be followed by the author names and the institution name and address. The title, author name(s), and affiliations should all appear on their own respective line of text. Place an asterisk after the name of the author to whom enquiries regarding the paper should be directed and include that author's telephone and fax numbers and e-mail address. Author affiliations must be footnoted using the following symbols in order (which should be used as superscripts): †, ‡, §, ¶, ††, †‡, †¶, †‡¶. In article titles, the words "new" or "novel" (with the latter referring specifically to a compound based on an unprecedented carbon skeleton) should not be included, and the number of new substances obtained should not be specified.

Abstract

The abstract, detailing, in one paragraph, the problem, experimental approach, major findings, and conclusions, should appear on the second page. It should be double spaced and should not exceed 200 words for Full Articles and Reviews or 100 words for Notes and Rapid Communications. Compounds mentioned in the abstract, and given as specific Arabic numerals that are bolded in the text, should also be accompanied in the abstract by the same bolded numerals. The abstract should be on a separate page and should be provided with the bolded and capitalized heading "ABSTRACT".

Introduction

The manuscript should include an untitled introduction stating the purpose of the investigation and relating the manuscript to similar research.

Results and Discussion

The "Results and Discussion" should be presented as a coherent whole section, in which the results are presented concisely. The discussion should interpret the results and relate them to existing knowledge in the field in as clear and brief a fashion as possible. Tables and figures

should be designed to maximize the presentation and comprehension of the experimental data. Authors submitting a manuscript as a Note should omit the heading "Results and Discussion". For Full Articles of unusual length, subheadings may be included within the "Results and Discussion" section. The major heading "RESULTS AND DISCUSSION" should be bolded and capitalized, with the text starting on the line following. Subheadings are indented, followed by a period, and are a mix of uppercase and lowercase letters. The text follows on the same line as the subheading.

Bolded structural code numbers should only be used for new compounds and for those known compounds for which new biological data or spectroscopic values are being reported. Other known compounds should be referred to in the text by name, wherever necessary. Sugar units in glycosides should not be inferred as *D* or *L* based solely on NMR data analysis, but should be determined by supporting experimental work such as measurement of their optical rotations following acid hydrolysis or by the preparation of chiral derivatives and comparison with standards using a chromatographic analytical method. If the aglycone of a glycoside is also a new compound, then it should be isolated and its physical constants and spectroscopic parameters stated. Authors are advised to use correctly the terms "relative and absolute configuration" instead of "relative and absolute stereochemistry". In, for example, a carbocyclic compound, only a stereogenic carbon or a stereogenic element, such as an axis, possesses configuration. Substituents such as methyl groups are either alpha or beta oriented and are not alpha or beta configured. Care should be taken not to make erroneous configurational conclusions via NMR NOE associations from ring to side-chain protons of, for example, sterols and tetracyclic triterpenoids. The term "spectral" should be avoided in a structure elucidation discussion, when "spectroscopic" or "spectrometric" are meant instead.

In manuscripts that present results of biological studies with tumor cell lines or animal-based tumor models, authors should pay special attention to the U.S. National Cancer Institute (NIH) guidelines for cancer drug discovery studies. Compounds that suppress the growth of, or kill, isolated tumor cell lines grown in culture should be referred to as either "cytostatic" or "cytotoxic", as appropriate. Only compounds that inhibit the growth of tumors in animal-based models should be called "antitumor". The term "anticancer" should be reserved for compounds that show specific activity in human-based clinical studies (see Suffness, M.; Douros, J. *J. Nat. Prod.* 1982, 45, 1–14). Some flexibility in this system is afforded in the description of compounds that show activity in molecular-targeted antitumor assays. Compounds should be compared against a suitable positive control substance and follow accepted guidelines when represented as "active". For example, a cytotoxic pure substance when tested against a cancer cell line would exhibit an IC_{50} value of $<10 \mu M$ (or 4–5 $\mu g/mL$).

Experimental Section

The presentation of specific details about instruments used, sources of specialized chemicals, and related experimental details should be incorporated into the text of the Experimental Section as a paragraph headed General Experimental Procedures. The general order for inclusion should be as follows: melting points; optical rotations; UV spectra; ECD and/or VCD spectra; IR spectra; NMR spectra; mass spectra; and chromatographic and other techniques.

In a separate paragraph, experimental biological material should be reported as authenticated if cultivated or from a natural habitat, and the herbarium deposit site and voucher number should be recorded. The month and year when the organisms were collected should be stated, and it is recommended that the exact collection location be provided using a GPS navigation tool. All microorganisms used experimentally should bear a strain designation number and the culture collection in which they are deposited. The scientific name (genus, species, authority citation, and family) should be presented when first mentioned in the body of the manuscript. Thereafter, the authority should be eliminated, and the generic name should be reduced (except in tables and figure legends) to the first capital letter of the name (but avoid ambiguity, if two or more generic names have the same first letter).

If the biological material has not been identified as to species, the manuscript will not be considered for publication unless a special protocol has been followed. Thus, a voucher specimen of the organism should be deposited with a recognized taxonomist for the particular group of organisms in question. The taxonomist should then assign to the specimen an identifying number unique to the organism so that any additional collections of the same organism would bear this same number. The number will be retained until the organism is completely identified. The taxonomist should write a brief taxonomic description to be included in the manuscript, which should state how the organism in question relates morphologically to known species. Contributors should use DNA sequence analysis to assist with the taxonomic identification of unknown microorganisms, and to deposit these data in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Photographs of incompletely identified organisms may be included as Supporting Information. Authors should be aware of the fact that the large-scale collection of marine or terrestrial organisms may have negative ecological effects. Authors describing an investigation derived from large-scale collections should thus include a statement in their manuscript (in the "Biological Material" paragraph of the Experimental Section) explaining why the collection had no significant adverse ecological effect or justifying such effect in terms of the benefit from the resulting work.

Authors who purchase dried "herbal remedies" or other materials from companies must make provision for their proper deposit in a herbarium, for access by future workers. When a commercially available extract is obtained, the extraction procedure from the organism of origin must be specified. The identification of the extract should be supported by an HPLC trace of known secondary metabolite constituents of the organism, which should be included with the manuscript as Supporting Information.

When physical and spectroscopic data are presented in the body of the manuscript, the following general style must be used (with the various commonly used techniques presented in this same order):

Romucosine (1): colorless needles (CHCl₃); mp 152–153 °C; [α]_D²⁰ -110 (c 0.4, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max}(log ε) 235 (4.23), 275 (4.18), 292 (sh) (3.52), 325 (3.41) nm; IR (Nujol) ν_{max} 1680, 1040, 920 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.11 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-11), 7.54–7.28 (2H, m, H-9, H-10), 7.27 (1H, m, H-8), 6.59 (1H, s, H-3), 6.10, 5.97 (each 1H, d, *J* = 1.5 Hz, OCH₂O), 4.86 (1H, dd, *J* = 13.7, 4.4 Hz, H-6a), 4.44 (1H, m, H-5a), 3.77 (3H, s, NCOOCH₃), 3.06 (1H, m, H-7a), 2.99 (1H, m, H-5b), 2.91 (1H, m, H-7b), 2.82 (1H, m, H-4a), 2.61 (1H, m, H-4b); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 155.8 (C, NCOOCH₃), 146.8 (C, C-2), 143.0 (C, C-1), 135.8 (C, C-7a), 130.7 (C, C-11a), 128.7 (CH, C-8), 127.79 (C, C-3a), 127.78 (CH, C-9), 127.2 (CH, C-10), 127.0 (CH, C-11), 125.6 (C, C-3b), 117.3 (C, C-1a), 107.6 (CH, C-3), 100.9 (CH₂, OCH₂O), 52.7 (CH₃, NCOOCH₃), 51.7 (CH, C-6a), 39.2 (CH₂, C-5), 34.5 (CH₂, C-7), 30.4 (CH₂, C-4); EIMS *m/z* 323 [M]⁺ (98), 308 (28), 292 (5), 262 (20), 248 (21), 236 (81), 235 (100), 206 (17), 178 (27), 88 (17); HREIMS *m/z* 323.1152 (calcd for C₁₉H₁₇O₄N, 323.1158).

The correct presentation of NMR spectroscopic data is shown in the table below.

Table 1. NMR Spectroscopy Data (400 MHz, CDCl₃) for A and B (1) and 1' (2)

Signal	¹ H NMR (400 MHz)		¹³ C NMR (100 MHz)	
	Chemical shift (ppm)	Integration	Chemical shift (ppm)	Assignment
1	8.11 (d)	1.00	155.8	C
2	7.54–7.28 (m)	1.00	146.8	C
3	6.59 (s)	1.00	143.0	C
4	6.10, 5.97 (d)	1.00	135.8	C
5	4.86 (dd)	1.00	130.7	C
6	4.44 (m)	1.00	128.7	CH
7	3.77 (s)	3.00	127.79	C
8	3.06 (m)	1.00	127.78	CH
9	2.99 (m)	1.00	127.2	CH
10	2.91 (m)	1.00	127.0	CH
11	2.82 (m)	1.00	125.6	C
12	2.61 (m)	1.00	117.3	CH
13	100.9 (CH ₂)	2.00	107.6	CH
14	52.7 (CH ₃)	3.00	100.9	CH ₂
15	51.7 (CH)	1.00	52.7	CH ₃
16	39.2 (CH ₂)	2.00	51.7	CH
17	34.5 (CH ₂)	2.00	39.2	CH ₂
18	30.4 (CH ₂)	2.00	34.5	CH ₂
19	155.8 (C)	1.00	155.8	C
20	146.8 (C)	1.00	146.8	C
21	143.0 (C)	1.00	143.0	C
22	135.8 (C)	1.00	135.8	C
23	130.7 (C)	1.00	130.7	C
24	128.7 (CH)	1.00	128.7	CH
25	127.79 (C)	1.00	127.79	C
26	127.78 (CH)	1.00	127.78	CH
27	127.2 (CH)	1.00	127.2	CH
28	127.0 (CH)	1.00	127.0	CH
29	125.6 (C)	1.00	125.6	C
30	117.3 (CH)	1.00	117.3	CH
31	100.9 (CH ₂)	2.00	100.9	CH ₂
32	52.7 (CH ₃)	3.00	52.7	CH ₃
33	51.7 (CH)	1.00	51.7	CH
34	39.2 (CH ₂)	2.00	39.2	CH ₂
35	34.5 (CH ₂)	2.00	34.5	CH ₂
36	30.4 (CH ₂)	2.00	30.4	CH ₂
37	155.8 (C)	1.00	155.8	C
38	146.8 (C)	1.00	146.8	C
39	143.0 (C)	1.00	143.0	C
40	135.8 (C)	1.00	135.8	C
41	130.7 (C)	1.00	130.7	C
42	128.7 (CH)	1.00	128.7	CH
43	127.79 (C)	1.00	127.79	C
44	127.78 (CH)	1.00	127.78	CH
45	127.2 (CH)	1.00	127.2	CH
46	127.0 (CH)	1.00	127.0	CH
47	125.6 (C)	1.00	125.6	C
48	117.3 (CH)	1.00	117.3	CH
49	100.9 (CH ₂)	2.00	100.9	CH ₂
50	52.7 (CH ₃)	3.00	52.7	CH ₃
51	51.7 (CH)	1.00	51.7	CH
52	39.2 (CH ₂)	2.00	39.2	CH ₂
53	34.5 (CH ₂)	2.00	34.5	CH ₂
54	30.4 (CH ₂)	2.00	30.4	CH ₂
55	155.8 (C)	1.00	155.8	C
56	146.8 (C)	1.00	146.8	C
57	143.0 (C)	1.00	143.0	C
58	135.8 (C)	1.00	135.8	C
59	130.7 (C)	1.00	130.7	C
60	128.7 (CH)	1.00	128.7	CH
61	127.79 (C)	1.00	127.79	C
62	127.78 (CH)	1.00	127.78	CH
63	127.2 (CH)	1.00	127.2	CH
64	127.0 (CH)	1.00	127.0	CH
65	125.6 (C)	1.00	125.6	C
66	117.3 (CH)	1.00	117.3	CH
67	100.9 (CH ₂)	2.00	100.9	CH ₂
68	52.7 (CH ₃)	3.00	52.7	CH ₃
69	51.7 (CH)	1.00	51.7	CH
70	39.2 (CH ₂)	2.00	39.2	CH ₂
71	34.5 (CH ₂)	2.00	34.5	CH ₂
72	30.4 (CH ₂)	2.00	30.4	CH ₂
73	155.8 (C)	1.00	155.8	C
74	146.8 (C)	1.00	146.8	C
75	143.0 (C)	1.00	143.0	C
76	135.8 (C)	1.00	135.8	C
77	130.7 (C)	1.00	130.7	C
78	128.7 (CH)	1.00	128.7	CH
79	127.79 (C)	1.00	127.79	C
80	127.78 (CH)	1.00	127.78	CH
81	127.2 (CH)	1.00	127.2	CH
82	127.0 (CH)	1.00	127.0	CH
83	125.6 (C)	1.00	125.6	C
84	117.3 (CH)	1.00	117.3	CH
85	100.9 (CH ₂)	2.00	100.9	CH ₂
86	52.7 (CH ₃)	3.00	52.7	CH ₃
87	51.7 (CH)	1.00	51.7	CH
88	39.2 (CH ₂)	2.00	39.2	CH ₂
89	34.5 (CH ₂)	2.00	34.5	CH ₂
90	30.4 (CH ₂)	2.00	30.4	CH ₂

NOTE 1: Integration values are given in parentheses.
 NOTE 2: Integration values are given in parentheses.
 * Integration values are given in parentheses.
 † Integration values are given in parentheses.

The correct format to present elemental analysis data is: anal. C 72.87, H 11.13%, calcd for $C_{37}H_{68}O_6$, C 73.02, H 11.18%. The structures of compounds are expected to be supported by high-resolution mass spectrometry or elemental analysis. Melting point determinations should not be provided for compounds described as “amorphous solids”. The unit of concentration to be used for optical rotation measurements is grams per 100 mL. UV extinction coefficient data should be provided as $\log \epsilon$ values, to two places of decimals. In reporting ^1H NMR data of diastereotopic methylene protons, the one at lower field should be listed as the “a” proton and that at the higher field as the “b” proton, as in “H-10a” and “H-10b”, respectively. If two proton or carbon signals in an NMR spectrum appear at the same chemical shift but are still distinguishable, an additional decimal place (three for ^1H NMR data and two for ^{13}C NMR data) may be used to designate the resonance in question. Carbon-13 NMR data should be reported to the nearest 0.1 ppm with the number of attached protons designated using the C, CH, CH_2 , and CH_3 notation.

Acknowledgments

The Acknowledgments section should include credits [initial(s) and last name] for technical assistance, financial support, and other appropriate recognition. During manuscript submission, the submitting author is asked to select funding sources from the list of agencies included in the FundRef Registry <http://www.crossref.org/fundref>.

References

References to the literature and all notes, regardless of their nature, should be numbered in order of appearance in the manuscript and cited in the text with superscript numbers. Each reference may have its own citation number, or alternatively, references referring to the same topic may be grouped under a common number using alphabetical subdesignations (e.g., 1a, 1b, 1c, etc.). Each note should be assigned its own number. References and notes should follow the format shown:

- (1) Dumdei, E.; Andersen, R. J. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 792–794.
- (2) Cordell, G. A. *Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach*; John Wiley & Sons: New York, 1981; p 43.
- (3) Pelletier, S. W.; Mody, N. V. In *The Alkaloids*; Rodrigo, R. G. A., Ed.; Academic Press: New York, 1981; Vol. 18, Chapter 2, pp 100–216.
- (4) Zheng, G.; Kakisawa, H. *Chin. Sci. Bull.* **1990**, *35*, 1406–1407; *Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 43213m.
- (5) Meyer, B. N. Brine Shrimp Toxicity: Certain Components of *Stapelia*, *Coryphantha*, *Lupinus*, and *Quinoa*. Ph.D. Thesis, Purdue University, West Lafayette, IN, 1983, p 35.
- (6) Davis, R. U.S. Patent 5,708,591, 1998.
- (7) The biogeographic zone comprising Madiera, the Canary Islands, the Cape Verde Islands, and the Azores.

For additional information on the reference and note format to use, see *The ACS Style Guide*, 3rd ed. (2006) (<http://pubs.acs.org/books>), available from Oxford University Press, Order Department, 2001 Evans Road, Cary, NC 27513 (<http://www.oup.com>).

The author is responsible for the accuracy and completeness of all references. In particular, authors must cite all of the references from their own work on a particular topic, such as all papers published or submitted on the constituents of a given organism under consideration. Because subscribers to the Web edition are now able to click on the "CAS" tag following each reference to retrieve the corresponding CAS abstract, reference accuracy is critical. Journal abbreviations should be those used by *Chemical Abstracts* [see *Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1907–2004*].

The author should supply the Editor with copies of related manuscripts that are cited as "in press" or "submitted" for use by the editors and the reviewers in evaluating the manuscript under consideration.

Nomenclature

It is the responsibility of the authors to provide correct nomenclature. All nomenclature must be consistent and unambiguous and should conform with current American usage. Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstracts Service, the International Union of Pure and Applied Chemistry, and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

Chemical Abstracts (CA) nomenclature rules are described in Appendix IV of the *Chemical Abstracts Index Guide*. A list of ring systems, including names and numbering systems, is found in the *Ring Systems Handbook*, American Chemical Society, Columbus, OH, 2003, and its latest cumulative supplement. For CA nomenclature advice, consult the Manager of Nomenclature Services, Chemical Abstracts Service, P.O. Box 3012, Columbus, OH 43210-0012. A name generation service is available for a fee through CAS Client Services, 2540 Olentangy River Road, P.O. Box 3343, Columbus, OH 43210-0334; tel: (614) 447-3870; fax: (614) 447-3747; or e-mail: answers@cas.org.

For IUPAC rules, see:

- *Nomenclature of Inorganic Chemistry, Recommendations, 1990*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, 1990.
- *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds, Recommendations, 1993*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, 1993.
- *Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A–F and H*; Pergamon Press: Elmsford, NY, 1979.
- *Compendium of Macromolecular Nomenclature*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, 1991.
- *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 2nd ed.; Portland Press, Ltd.: London, England, 1992.
- Selected IUPAC recommendations can be found on the Web at <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/iupac.html>.
- The ACS Web site has links to nomenclature recommendations: <http://chemistry.org>.

Abbreviations

Abbreviations are used without periods. Standard abbreviations should be used throughout the manuscript. All nonstandard abbreviations should be kept to a minimum and must be defined in the text following their first use. The preferred forms of some of the more commonly used abbreviations are mp, bp, °C, K, s, min, h, mL, μ L, kg, g, mg, μ g, cm, mm, nm, mol, mmol, μ mol, ppm, TLC, GC, NMR, MS, UV, CD, and IR. For further information, refer to *The ACS Style Guide* (2006).

Graphics

Figures, Schemes, and Charts are numbered with Arabic numerals. Blocks of chemical structures should not be designated as "Figures". Each graphic must be identified outside the frame of the graphic. The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Graphics cannot be modified or enhanced by the journal production staff. The graphics must be submitted as part of the manuscript file and are used in the production of the Journal (material deposited as Supporting Information will not be published in the print edition). The preferred submission procedure is to embed graphics in a Word document. It may help to print the manuscript on a laser printer to ensure all artwork is clear and legible.

Additional acceptable file formats are TIFF, PDF, EPS (vector artwork), or CDX (ChemDraw file). Labeling of all figure parts should be present, and the parts should be assembled into a single graphic. (For EPS files, ensure all fonts are converted to outlines or embedded in the graphic file. The document settings should be in RGB mode.)

TIFF files should have the following minimum resolution requirements:

Black and white line art	1200 dpi
Grayscale art	600 dpi
Color art (RGB mode)	300 dpi

Color graphics submitted in CMYK or at lower resolution may result in poor-quality images. Save graphic files at the final resolution and size using the program used to create the graphic. The inclusion of a color photograph is particularly recommended for manuscripts based on the constituents of organisms that are not identified beyond the genus level. Digital photographs are accepted. Photographs that are single or double column width so that they will not have to be reduced work best.

Layout. In preparing structures for publication, layout is critical. Figures, Schemes, Charts, and blocks of structures are presented in the Journal either in one-column or two-column format.

For efficient use of journal space, single-column illustrations are preferred.

	single (preferred)	double
width		
minimum		300 pts (4.16 in.)
maximum	240 pts (3.33 in.)	504 pts (7 in.)
maximum depth	660 pts (9.16 in.)	660 pts (9.16 in.)

Authors are advised that structural material labeled as a "Figure" is placed at the top or bottom of a page, as is all two-column material. All structural material that should immediately follow certain text must be designed to fit the one-column format, and its location in the text must be indicated in the manuscript. Structures, arrows, and compound designators should be arranged so as to make maximum use of the width afforded by the one-column or two-column format.

For best results, illustrations should be submitted in the actual size at which they should appear in the Journal. Consistently sized letters and labels in graphics throughout the manuscript will help ensure consistent graphic presentation for publication. Lettering should be no smaller than 4.5 points. (Helvetica or Arial type works well for lettering.) Lines should be no thinner than 0.5 point. Lettering and lines should be of uniform density. If artwork that should be reduced must be submitted, larger lettering and thicker lines should be used so that, when reduced, the artwork meets the above-mentioned parameters.

Complex textures and shading to achieve a three-dimensional effect should be avoided. To show a pattern, a simple cross-hatch design should be used.

Content. Abbreviations such as Me for CH₃, Et for C₂H₅, and Ph (but not ϕ) for C₆H₅ are acceptable. Make liberal use of "R and X groups" in equations, schemes, and structure blocks to avoid the repetition of similar structures. Do not repeat a structure; the number alone of an earlier structure can be used if a compound occurs several times. Within graphics, structures should be numbered with boldface Arabic numerals, consecutively from left to right, top to bottom, regardless of the order in which the compounds are discussed in the text. It is not necessary to give reagents and conditions in complete detail, since this detail is contained in the Experimental Section. Where needed, numbers such as NMR chemical shifts may be included directly on structural formulas.

Chemical Structures

Structures should be produced with the use of a drawing program such as ChemDraw. Structure drawing preferences (preset in the ACS Stylesheet in ChemDraw) are as follows:

- (1) As drawing settings select:

chain angle	120°
bond spacing	18% of width
fixed length	14.4 pt (0.508 cm, 0.2 in.)
bold width	2.0 pt (0.071 cm, 0.0278 in.)
line width	0.6 pt (0.021 cm, 0.0084 in.)
margin width	1.6 pt (0.056 cm, 0.0222 in.)
hash spacing	2.5 pt (0.088 cm, 0.0347 in.)

- (2) As text settings select:

font	Arial/Helvetica
size	10 pt

- (3) Under the preferences choose:

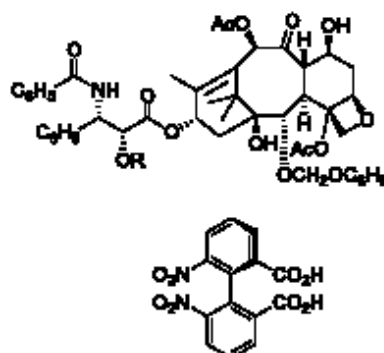
units	points
tolerances	5 pixels

- (4) Under page setup choose:

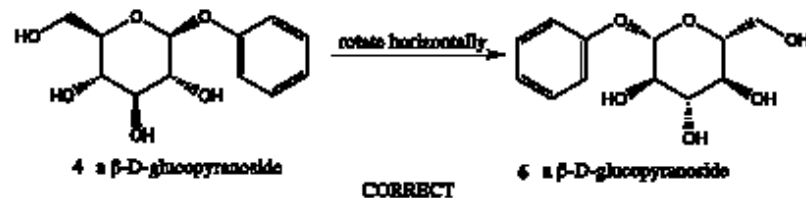
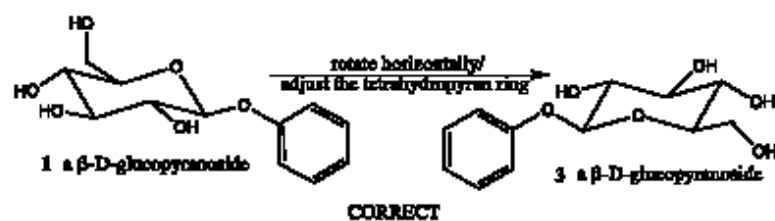
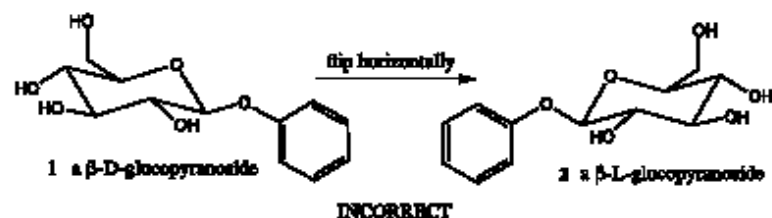
Paper	US Letter
Scale	100%

- (5) Using the ChemDraw ruler or appropriate margin settings, create structure blocks, schemes, and equations having maximum widths of 11.3 cm (one-column format) or 23.6 cm (two-column format). Note: if the foregoing preferences are selected as cm values, the ChemDraw ruler is calibrated in cm. ChemDraw graphics will be reduced to 75% during production.
- (6) Embolden compound numbers, but not atom labels or captions.

- (7) Authors are urged to use only a single configurational descriptor (heavy line or dashed line, but not both) when defining a stereocenter in a chemical structure. Atoms should be kept outside of rings wherever possible. Rather than rectangular solid and dashed lines, authors should use solid and dashed wedges to indicate configurations, as shown below. Dots at ring junctions intended to represent hydrogen atoms should not be used. Structures should be drawn in a neat manner ready for direct reproduction, and should not be cluttered or overlapping. Any arrows and numbering used for atoms in figures should not come into contact with bonds or ring systems. See an example of a prepared structure using ChemDraw with the specified preferences below. In molecules containing a chiral biphenyl axis, it is recommended that one of the aromatic rings be drawn in the plane of the paper and the second one be rotated out of the plane of the paper, to reflect the P or M conformation about the biphenyl bond (see below for example).



When the structure of a chiral compound is flipped horizontally, the stereodescriptors should be changed at every stereogenic carbon, otherwise the enantiomer of the relevant compound would be depicted. This is depicted below for the β -D-glucopyranosyl moiety of phenol. The 1 to 2 horizontal flip is incorrect since the depicted glucopyranosyl moiety belongs to the L-series of glucopyranoses. The 1 to 3 horizontal rotation through 180° /adjustment of the tetrahydropyran ring is correct and shows the descriptor changes required to retain the D-configuration of the glucopyranose moiety. Alternatively, in the "planar" presentations the 4 to 5 horizontal flip is incorrect and the 4 to 6 horizontal rotation is correct, showing the proper descriptor changes. Please note that presentations 4 and 6 are InChI (International Chemical Identifier) compliant, while 1 and 3 are not.



Authors using other drawing packages should, in as far as possible, modify their program's parameters so that they reflect the above guidelines.

Tables

These should be numbered consecutively with Arabic numerals and should be placed as they should appear in the paper. Footnotes in tables should be given lowercase letter designations and be cited in the table by italic superscript letters. The sequence of letters should proceed by line rather than by column. If a footnote is cited both in the text and in a table, insert a lettered footnote in the table to refer to the numbered footnote in the text. Each table should be provided with a descriptive heading, which, together with the individual column headings, should make the table, as nearly as possible, self-explanatory. In setting up tabulations, authors are requested

to keep in mind the type area of the journal page (17.8 × 25.4 cm) and the column width (8.5 cm), and to make tables conform to the limitations of these dimensions. Arrangements that leave many columns partially filled or that contain much blank space should be avoided.

Table of Contents/Abstract Graphic

A graphic must be included with each manuscript that will be used for both the abstract and the Table of Contents (TOC) of the Web edition of the Journal issue in which the Communication, Review, Full Article, or Note will appear. This graphic should capture the reader's attention and, in conjunction with the manuscript's title, should give the reader a quick visual impression of the type of chemistry described and/or the biological results obtained. Structures in the TOC graphic should be constructed as specified in the 'Chemical Structures' section above. The TOC graphic should be submitted at the actual size to be used and should be no larger than 3.25 in. (8.5 cm) wide and 1.75 in. (4.75 cm) tall. (See detailed instructions at <http://pubs.acs.org/page/4authors/submission/howtosubmit.html>.) Text should be limited to labels for compounds, reaction arrows, and figures. The use of color to enhance the scientific value is highly encouraged. The TOC graphic should be inserted on a separate page at the end of the manuscript file. The title and author list will be added during production.

Recommendations for Crystal Structure Papers

Although the results of crystal structure determinations are frequently of interest to readers of the Journal, details of crystal structure experiments are generally not. Results appropriate for the Journal are not, however, sufficient to allow referees to assess the quality of an X-ray structure determination. Thus, it is recommended that manuscripts involving such determinations be accompanied by material provided for the benefit of the reviewers only. Authors should submit the following minimum materials, in tabular form where possible, for each compound for which X-ray crystallographic supplementary data are available.

Published Manuscript:

- (1) Crystal data, including chemical formula, formula weight, crystal system and space group, cell dimensions (with uncertainties), number of formulas per unit cell, calculated density, radiation used, and wavelength.
- (2) Final fractional atomic coordinates. Hydrogen atom coordinates should be included only if they have been experimentally determined or refined. Calculated coordinates should be provided as reviewer's material.
- (3) A *brief* outline of procedures used for data collection and refinement, including the method used for intensity measurement, θ limits, portion of the full sphere collected, handling of absorption (if applicable), method of refinement, number of reflections used in the refinement and criteria for their choice, treatment of hydrogen atoms, and final *R* factor.
- (4) A perspective diagram (perhaps prepared by ORTEP, PLUTO, or similar programs) that gives the atom-numbering scheme if it is not unambiguous from the remainder of the paper. If the figure is a stereoview, it should be provided reduced to correct size, about 55–60 mm between images.

Besides a description of the structure, other information (i.e., important distances, torsion angles, results of best plane calculations, etc.) may be included if appropriate. A note should be cited at an appropriate place in the manuscript and included in the References and Notes Section: "Crystallographic data for the structure(s) reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44-(0)1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)."

Conflict of Interest Disclosure. A statement describing any financial conflicts of interest or lack thereof is published with each manuscript. During the submission process, the corresponding author must provide this statement on behalf of all authors of the manuscript. The statement should describe all potential sources of bias, including affiliations, funding sources, and financial or management relationships, that may constitute conflicts of interest (please see the ACS *Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research*). The statement will be published in the final article. If no conflict of interest is declared, the following statement will be published in the article: "The authors declare no competing financial interest."

Reviewer's Material:

- (1) Any calculated coordinate (e.g., hydrogen atoms).
- (2) A full list of bond distances (and their uncertainties).
- (3) A full list of bond angles (and their uncertainties).

All tables should be clearly legible, the contents nonredundant, and their interpretation immediately obvious. Authors must provide this information in the form of a Crystallographic Information File (CIF) for each compound for which X-ray crystallographic data are determined, with each CIF being separated from any other Supporting Information files.

Authors will deposit the tables of final fractional atomic coordinates and the full list of bond lengths and angles at the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) prior to the submission of their paper. The CCDC deposition number must be included in the submitted manuscript. A checklist of data items for deposition is available at <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.

Supporting Information

Authors are encouraged to provide Supporting Information in order to keep their manuscripts to a reasonable length. The Web edition of this journal can accommodate almost any type of supplementary data (e.g., reproductions of spectra, experimental procedures, tabulated spectroscopic/spectrometric data, expanded discussion of peripheral findings, calculational data). Supporting Information must be submitted at the same time as the manuscript and uploaded separately to the ACS Paragon Plus environment. A list of acceptable file types is available on the Web. All Supporting Information files of the same type should be prepared as a single file (rather than submitting a series of files containing individual images or structures). For example, all Supporting Information available as PDF files should be contained in one PDF file. The title page information (title, authors, institutions) should be presented in the same manner as on the title (face) page of the manuscript. It is a mandatory requirement for authors to deposit copies of NMR spectra for all new compounds in the Supporting Information with at least the ^1H and ^{13}C

NMR spectra included. A typical caption for a spectrum would be: “S1. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of the new compound **xx**”. A short “Supporting Information Available” paragraph that describes the material must be placed at the end of the manuscript text. Supporting Information pages should be consecutively numbered.

When submitting spectra, please consider the following guidelines:

A caption should be included on the spectrum, noting the nucleus being measured, the solvent (formula preferred, e.g., CDCl_3), and the field strength. A representation of the compound should be included on the spectrum; please use ChemDraw or a related program. The compound identifier used in the manuscript should be included. The largest peak in the ^1H NMR spectrum should normally arise from the compound, not the solvent. All peaks in the ^1H NMR spectrum should be integrated. Chemical shift values should be included. The solvent peak should be clearly labeled on the spectrum. All peaks should be visible on the spectrum. Insets are encouraged to show expanded regions. At minimum, the spectral window should be -1 ppm to 9 ppm for ^1H NMR and -10 ppm to 180 ppm for ^{13}C NMR. The font should be clear and large enough to read (minimum of 10 point). Horizontal orientation is preferred for spectra.

DO NOT UPLOAD FIGURES AND TABLES THAT ARE TO BE PUBLISHED IN THE ARTICLE.

Relevant compounds reported in Supporting Information are indexed for *Chemical Abstracts* and assigned Registry Numbers, even if they are not mentioned in the published paper. The Supporting Information is available free of charge at <http://pubs.acs.org>.

Journal Publishing Agreement

A properly completed and signed Journal Publishing Agreement must be submitted for each manuscript. ACS Paragon Plus provides an electronic version of the Agreement that will be available on the My Authoring Activity tab of the Corresponding Author's Home page once the manuscript has been assigned to an Editor. A PDF version of the Agreement is also available, but **Authors must use the electronic Journal Publishing Agreement.** If the PDF version is used, **all pages of the signed PDF Agreement must be submitted.** If the Corresponding Author cannot or should not complete either the electronic or PDF version for any reason, another Author should complete and sign the PDF version of the form. Forms and complete instructions are available at <http://pubs.acs.org/page/copyright/journals/index.html>.

Assistance with English Language Editing

Authors may want to have their manuscripts edited professionally before submission to improve clarity. The ACS ChemWorx English Editing Service can assist you in improving and polishing the language in your manuscript. You can learn more about the services offered, at <http://es.acschemworx.acs.org>.

Author List

During manuscript submission, the submitting author must provide contact information (full name, e-mail address, institutional affiliation, and mailing address) for all of the co-authors. Because all of the author names are automatically imported into the electronic Journal Publishing

example, 1 (one) and l (ell), 0 (zero) and O (oh), x (ex) and × (times sign). Check the final copy carefully for consistent notation and correct spelling.

The manuscript should be assembled in the following order and should consist of *one* file: Title page; abstract; all sections of the body of the paper, including figures, schemes, charts, and tables; acknowledgments; Supporting Information paragraph (if needed); references; TOC graphic. Supporting information should be provided in a separate file. It is best to use the fonts "Times" and "Symbol". Other fonts, particularly those that do not come bundled with the system software, may not translate properly. Ensure that all special characters (e.g., Greek characters, math symbols, etc.) are present in the body of the text as characters and not as graphic representations. Consult the documentation for the specific software package being used on how to detect the presence of graphics in the files, and replace them with the appropriate text characters. Tables may be created using a word processor's text mode or table format feature. The table format feature is preferred. Ensure each data entry is in its own table cell. If the text mode is used, separate columns with a single tab and use a line feed (return) at the end of each row.

Currently Acceptable Word Processing Packages

Macintosh: WordPerfect 3.5, Microsoft Word, 98 and higher.

IBM and compatibles: WordPerfect, up to version 9.0, Microsoft Word, 97 and higher.

LaTeX users should follow the guidelines given at the Author & Reviewer Resource Center (<http://pubs.acs.org/4authors>).

ACS Policies for E-prints and Reprints

Under the ACS Articles on Request policy, the Society will provide (free of charge) to all contributing authors a unique URL within the ACS Web site that they may e-mail to colleagues or post on external Web sites. These author-directed links are designed to facilitate distribution of an author's published work to interested colleagues in lieu of direct distribution of the PDF file by the author. The ACS Articles on Request policy allows 50 downloads within the first year after Web publication and unlimited access via the same author-directed links 12 months after Web publication.

The ACS AuthorChoice option establishes a fee-based mechanism for authors or their research funding agencies to sponsor the open availability of their articles on the Web at the time of online publication. Effective January 1, 2014, ACS AuthorChoice will be expanded to offer authors a wider range of open access license options, such as Creative Commons licenses and provisions for immediate or 12-month embargoed open access, both coupled with a new ACS Certified Deposit service. For complete details see <http://acsopenaccess.org/>.

When authors are sent the proof of their paper, they will receive a link to a website where they may order author reprints. They may also call Cierant Corporation (866-305-0111) from 9:00 A.M. to 5:00 P.M. EST. Reprints will be shipped within two weeks after the issue publication date. Neither the Editors nor the Washington ACS Office keeps a supply of reprints; requests for single copies of papers should be addressed to the corresponding author of the paper concerned.

Galley Proofs

The corresponding author of an accepted manuscript will receive e-mail notification and complete instructions when page proofs are available for review via a secure Web site. Authors will access the secure site through ACS ChemWorx and will need an ACS ID. To obtain an ACS ID or to reset your password, go to www.acschemworx.org. Routine rephrasing of sentences or additions are not permitted at the page proof stage. Alterations should be restricted to serious changes in interpretation or corrections of data. Extensive or important changes on page proofs, including changes to the title or list of authors, are subject to Editorial review.

It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within 48 hours of receipt in order to ensure timely publication of the manuscript.

The ASAP date is the recorded publication date. All intellectual property and patent details must be resolved prior to ASAP publication.

Corrections

If errors of consequence are detected in a published paper, the author should send a correction to the Editor-in-Chief for publication as an "Addition and Correction".