

Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese

Implantation of two biological membranes in a corneal micropocket as an experimental model for angiogenesis

Angélica de Mendonça Vaz SAFATLE¹, Paulo Sergio de Moraes BARROS¹, Benjamin Eurico MALUCELLI², José Luiz GUERRA²

CORRESPONDÊNCIA PARA:
ANGÉLICA DE MENDONÇA VAZ SAFATLE
Departamento de Cirurgia
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária Armando Salles Oliveira
05508-270 – São Paulo – SP
e-mail: angsaf@usp.br

1- Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP
2- Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP

RESUMO

A angiogênese participa de inúmeros processos fisiológicos e patológicos. Vários modelos experimentais são encontrados na literatura mostrando a importância de seu estudo. Estabelecemos um modelo de angiogênese utilizando duas membranas biológicas – pericárdio e membrana amniótica equinas conservadas em glicerina, implantadas em microbolsa em córnea de 63 ratos. Implantou-se pericárdio na córnea direita e membrana amniótica na córnea esquerda, de tal forma que pudemos analisar os resultados em um mesmo animal. As córneas dos animais foram submetidas à análise histológica aos 1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. A angiogênese induzida pelo pericárdio xenólogo foi mais intensa e mais duradoura que a membrana amniótica xenóloga. Concluímos que ambas as membranas biológicas induziram angiogênese corneana após terem sido implantadas no interior do estroma em ratos, podendo ser utilizadas como modelo de angiogênese.

PALAVRAS-CHAVE: Angiogênese. Córnea. Membranas Biológicas. Modelo experimental. Rato.

INTRODUÇÃO

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935, por HERTIG, ao descrever a formação de novos vasos sanguíneos na placenta. Atualmente, conceitua-se angiogênese ou neovascularização, o crescimento de novos capilares a partir de capilares e vênulas pré-existentes⁶.

Ela participa de inúmeros processos biológicos, como cicatrização de ferida, circulação colateral, crescimento tumoral, desenvolvimento embrionário¹⁴ e reparação endometrial².

O equilíbrio entre os fatores angiogênicos e anti-angiogênicos é o responsável pela regulação da angiogênese. Quando há estímulo angiogênico, as células endoteliais alteram sua morfologia, provocam vasodilatação, degradam a membrana basal, proliferam e migram, formando capilares^{7,26}.

Estudos sobre angiogênese ganharam importância após 1946, quando observaram uma área hiperêmica ao redor do implante de tecido tumoral de ratos no subcutâneo, enquanto que o implante de tecido adulto rígido não induzia hiperemia local. Vários trabalhos foram feitos na tentativa de se confirmar a hipótese de que os tumores seriam angiogênico-dependentes¹².

A angiogênese tem importante papel na oncologia

devido a participação de capilares no crescimento das neoplasias, pois a proliferação e a sobrevivência das células neoplásicas dependem de suprimento adequado, de fatores de crescimento e remoção de moléculas tóxicas¹¹.

Além da oncologia, outras áreas onde o estudo da angiogênese tem se mostrado importante são no desenvolvimento da placa de ateroma e em várias doenças que são dependentes ou onde as células endoteliais tem uma participação importante como na psoríase, na retinopatia diabética, na degeneração macular²⁰, na artrite reumatóide, na fibroplasia retro-lentiniária, angiofibroma, hemangioma e glaucoma vascular¹², além de processos fisiológicos como ovulação, crescimento endometrial cíclico e de folículos pilosos, morfogênese, inflamação crônica e algumas reações imunes.

O contrário também pode ocorrer, ou seja, doenças que são decorrentes de um crescimento capilar lento ou insuficiente, como na cicatrização lenta de feridas, na não consolidação de fraturas e em algumas mal formações congênitas, que pode ser exemplificada pela microssomia hemifacial que é caracterizada por falha na vascularização regional, durante o crescimento fetal¹².

A multiplicidade de modelos encontrados na literatura mostra a importância que teve e continua tendo o estudo da angiogênese. O modelo ideal para este estudo teria como características, proteger ao máximo as células endoteliais de

influências externas, permitir quantificação repetitiva durante tempo prolongado, permitir a caracterização fisiológica dos vasos estudados, ser simples e não dispendioso¹⁷.

É de primordial importância que os ensaios *in vivo* e *in vitro* sejam altamente sensíveis e específicos para que se pesquise a neovascularização empregando substâncias angiogênicas e anti-angiogênicas.

A córnea é considerada como um bom sítio para o estudo da angiogênese devido à sua visibilidade, ser acessível e avascular, contribuindo para a mensuração biomicroscópica da resposta neovascular^{14,18,19}. Além disso, a córnea, por ter sua estrutura muito bem definida, proporciona, com facilidade, identificação histológica de novos vasos sanguíneos, células inflamatórias, novos fibroblastos e novo colágeno¹⁸.

Embora a córnea tem sido utilizada como modelo de pesquisa sobre angiogênese por mais de 100 anos, a causa exata da angiogênese corneana ainda não está totalmente esclarecida⁸.

Vários foram os modelos utilizados para o estudo da angiogênese utilizando a córnea de coelhos e dentre eles podemos citar: injeção intraestromal de substâncias¹⁸, injúria térmica ou química²⁸, implantação de tumores intraestromais e mais recentemente, a criação de microbolsas contendo endotoxina derivada de *Escherichia coli*, ou implantação intraestromal de *pellets* contendo fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e sucralfato. Em córnea de ratos, trabalhos foram feitos com implantação intraestromal de células tumorais e injeção de interleucina-2, na tentativa de se induzir o crescimento de vasos sanguíneos tanto pelos fatores angiogênicos secretados pelas células tumorais, como pela inflamação e mediadores imunológicos¹⁹ e cauterização química com associação de nitrato de prata e nitrato de potássio na proporção 3:1⁵.

A microbolsa corneana foi desenvolvida por GIMBRONE *et al.*¹⁶ em coelhos, consistindo na confecção de uma microcavidade entre as camadas de colágeno da córnea, onde se pode colocar substâncias, implantes neoplásicos e outros tecidos com o objetivo de se testar sua ação angiogênica.

Em 1981, FOURNIER *et al.*¹³ utilizaram o rato como modelo experimental de angiogênese, confeccionando microbolsa corneana e implantando pellets umedecidos com extrato de tumor Walker 256.

Uma grande variedade de desordens corneanas culminam em uma resposta angiogênica, provocando formação de novos vasos sanguíneos que se estendem centripetamente na córnea²⁹.

Os efeitos benéficos da invasão vascular são evidentes quando a córnea injuriada cicatriza. O fator indesejável da vascularização é visto quando resulta em uma perda da transparência corneana, principalmente na área pupilar, podendo haver deposição de lipídeos¹⁰.

A presença de vasos em uma córnea cicatrizada torna-se muito mais reativa em decorrência de um inevitável crescimento de vasos linfáticos que acompanham a neovascularização, potencializando, em muito, a rejeição de enxertos, perdendo sua vantagem imunológica²⁸.

O estudo da angiogênese na córnea é de grande valia, pois além de algumas oftalmopatias provocarem neovascularização corneana, resultando em diminuição da acuidade visual ou mesmo cegueira, a córnea é um tecido onde a angiogênese pode ser quantificada^{13,18}.

Com o intuito de contribuir para a compreensão da neoformação vascular, objetivamos estabelecer um modelo de angiogênese utilizando duas membranas biológicas – pericárdio e membrana amniótica equina - preservadas em glicerina implantadas em microbolsa na córnea de ratos.

MATERIAL E MÉTODO

Utilizou-se 63 ratos albinos da linhagem Wistar, fêmeas, adultas, com peso de 170 a 220 g, hígdas, sem qualquer lesão corneana.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina (30mg/kg) e cloridrato de xilazina (6mg/kg) associados na mesma seringa.

Utilizou-se dois tipos de membranas biológicas: pericárdio e membrana amniótica de equino conservadas em glicerina a 98%.

Antes da implantação destas membranas, procedemos sua hidratação, submergindo-as em solução de Cloreto de Sódio 0,9% por 15 minutos.

Estando o animal em decúbito lateral e com auxílio de microscópio cirúrgico, fragmentos de 1mm x 1mm foram introduzidos no interior do estroma da córnea. Confeccionou-se microbolsa próxima ao limbo (1,0 mm) onde introduziu-se pericárdio na córnea direita e membrana amniótica na córnea esquerda, de tal forma que pudemos analisar os resultados em um mesmo animal.

Análise Histológica

Cinqüenta e quatro ratos submetidos ao implante de membranas biológicas na córnea foram sacrificados aos 1, 3, 7, 15, 30, 60 dias de pós-operatório (nove por período) e nove ratos do grupo controle, submetidos apenas a ceratotomia e formação da microbolsa, que foram sacrificados aos 1, 3 e 7 dias de pós-operatório (3 por período).

Os globos oculares foram enucleados e fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas.

Posteriormente as córneas foram removidas, preservando a região córneo-escleral e seccionadas em quatro partes, sendo que as partes que continham o implante ou microbolsa foram desidratadas em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo (5µm de espessura). A seguir, estes

fragmentos foram corados pela hematoxilina-eosina e analisados em microscopia de luz.

Durante a análise histológica, avaliou-se a presença de células inflamatórias polimorfo e mononucleares, fibroцитos, fibroblastos, neovascularização, colageinização do tecido implantado e regeneração epitelial. Para quantificar a neovascularização periférica (próxima ao limbo) e central (próxima ao implante) de ambas as membranas implantadas e periférica no grupo controle, empregou-se critério subjetivo quali-quantitativo: (nihil) ausência, (+) leve, (++) moderado, (+++) intenso e (++++) acentuado. Fig. 1 e 2.

RESULTADOS

Os exames histológicos foram realizados nas córnea dos animais que receberam os implantes de pericárdio e de membrana amniótica nos tempos de 1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias e nos animais controle, ou seja, que foram submetidos apenas à execução da microbolsa nos tempos de 1, 3 e 7 dias. Atenção especial foi dada à neovascularização periférica (próxima ao limbo) e central (próxima ao implante) em ambos os implantes, que foram descritas em todos os tempos pré-estabelecidos e para quantificá-las, empregou-se critério subjetivo quali-quantitativo.

Após 1 dia do implante, notou-se um quadro reacional similar entre as duas membranas, caracterizado por dilatação venular intensa na região próxima ao limbo com migração de polimorfonucleares através do estroma, podendo chegar até o implante, caracterizando a fase aguda do processo inflamatório. Observou-se a dissociação das fibras de colágeno e a alteração da forma do núcleo das células epiteliais de arredondado para alongado, devido ao edema aí instalado. Não foi detectado presença de neovasos até o presente momento em ambos os implantes.

Aos 3 dias do implante detectou-se um adelgaçamento total do epitélio, além de um deslizamento sobre a margem do implante. Observou-se a neoformação vascular próxima

ao limbo e não próxima ao enxerto. Esta neoformação vascular foi mais intensa nos animais que receberam o implante de pericárdio. Em todos os animais observou-se pouca proliferação de fibroblasto. Notou-se a diminuição dos polimorfonucleares sugerindo o desaparecimento da fase aguda.

A neoformação vascular próxima ao enxerto foi detectada aos 7 dias do implante, juntamente com a proliferação fibroblástica, iniciando o processo de formação de tecido de granulação próximo à região implantada. A neovascularização mostrou-se mais intensa na maioria dos animais que receberam o pericárdio como implante. Por todo o estroma visualizou-se a proliferação fibroblástica e neovascularização. Já se observava a regeneração epitelial com hiperplasia do mesmo. Havia a presença de células mononucleares e polimorfonucleares adjacentes ao tecido implantado.

Os 15 dias foram caracterizados como auge da fase de neovascularização próxima a região implantada, nos animais que receberam os dois tipos de implante, porém a neovascularização induzida pelo pericárdio mostrou-se mais intensa quando comparada com a membrana amniótica. Encontrou-se, em todo o estroma, células mononucleares. Verificou-se em apenas um animal implantado, uma pequena área de calcificação distrófica. Neste período observou-se os fibroцитos.

A neovascularização persistiu ao 30 dias em ambos os implantes, porém de forma mais intensa no pericárdio. Encontrou-se ainda, algumas células mononucleares e fibroцитos em ambos os grupos. Observou-se a regeneração epitelial e a presença de algumas células gigantes.

Aos 60 dias observou-se a presença de poucos neovasos nos animais que receberam o pericárdio com implante e ausência nos animais que receberam o implante da membrana amniótica. Em alguns casos detectou-se reação tipo corpo estranho, com formação de células gigantes. Fig. 3.

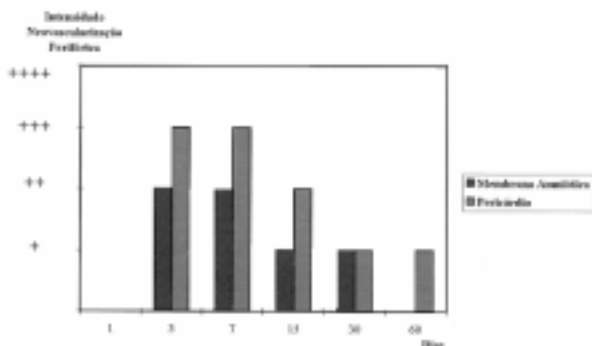


Figura 1

Intensidade de neovascularização periférica induzida pela membrana amniótica e pericárdio, visibilizadas à microscopia óptica aos 1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. (nihil) ausente; (+) leve, (++) moderada, (+++) intensa; (++++) acentuada.

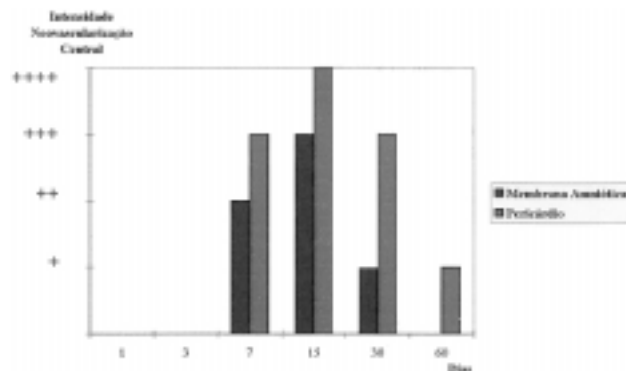


Figura 2

Intensidade de neovascularização central induzida pela membrana amniótica e pericárdio, visibilizadas à microscopia óptica aos 1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. (nihil) ausente; (+) leve, (++) moderada, (+++) intensa; (++++) acentuada.

SAFATLE, A.M.V.; BARROS, P.S.M.; MALUCELLI, B.E.; GUERRA, J.F. Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.4, p. 189-195, 2002.

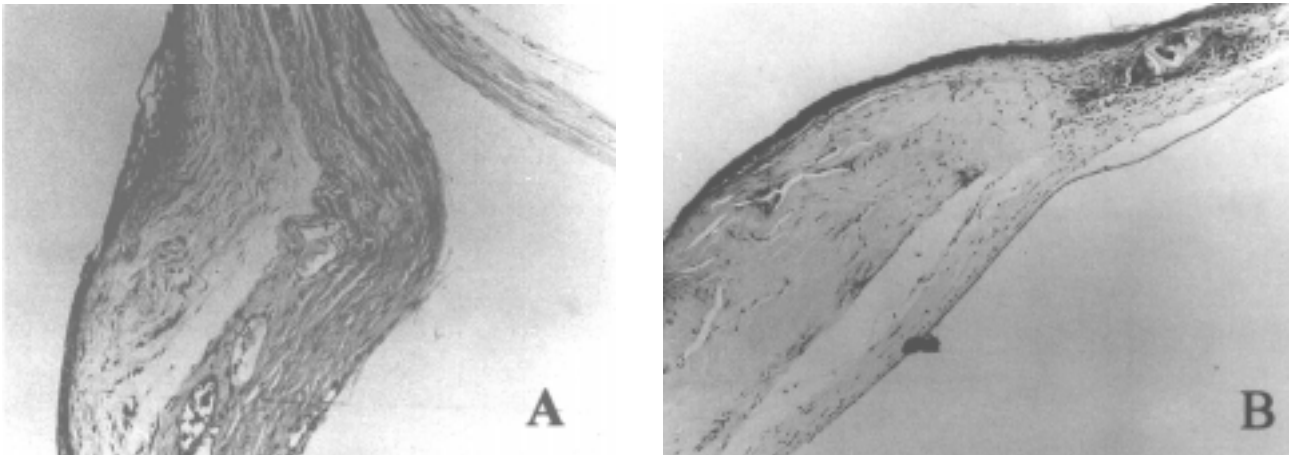


Figura 3

Imagem fotomicrográfica de córnea de ratos aos 60 dias do implante: A) implante de pericárdio, mostrando a presença de vasos noformados periféricos remanescentes. HE 160x; B) implante de membrana amniótica, mostrando o tecido implantado colageinizado e com raros fibrócitos. HE 40x.

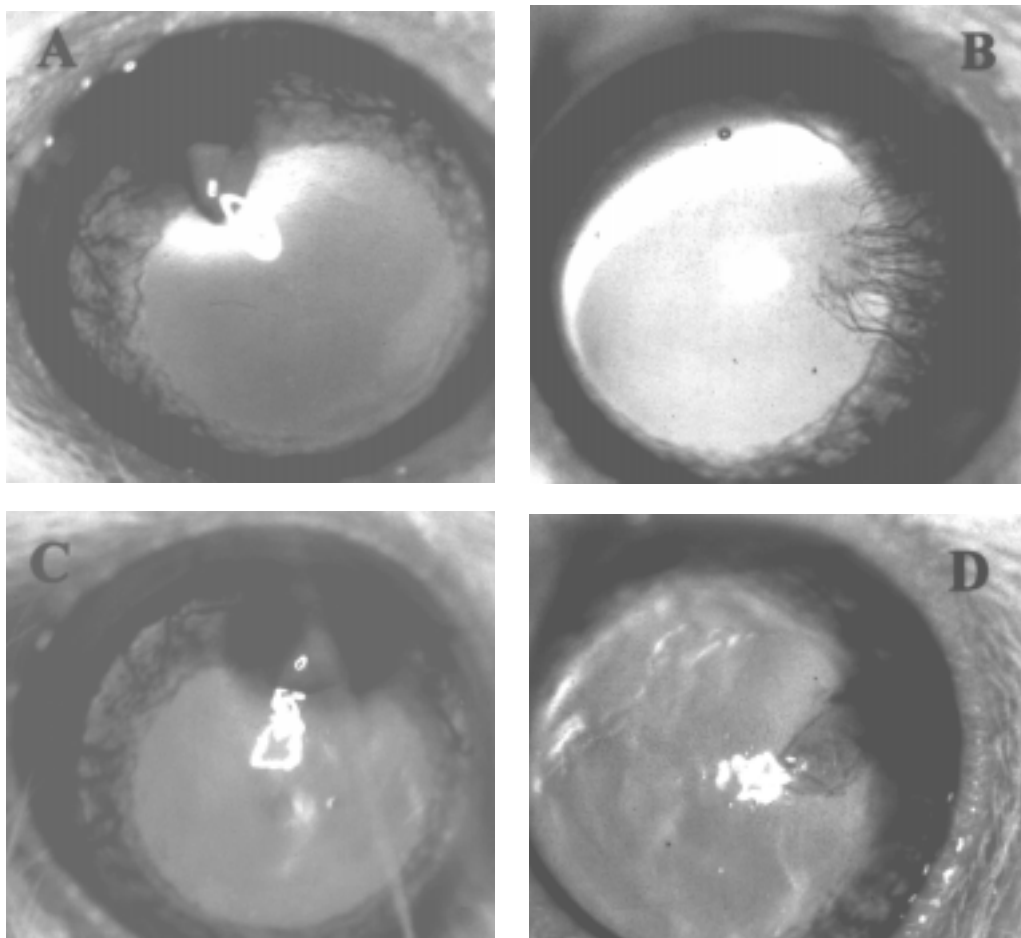


Figura 4

Fotomicrografia de globos oculares de rato mostrando neovascularização corneana: A) implante de pericárdio aos 7 dias; B) implante de membrana amniótica aos 7 dias; C) implante de pericárdio aos 15 dias; D) implante de membrana amniótica aos 15 dias.

Nos animais do grupo controle, após 24 horas, observou-se a presença de poucos polimorfonucleares distribuídos ao longo do estroma, desde a região subepitelial até o endotélio com discreto edema. Aos 3 dias notou-se ausência de células inflamatórias e neoformação vascular e após 7 dias, o epitélio encontrou-se regenerado com ausência de granulação.

DISCUSSÃO

Avascularidade da córnea é mantida por um balanço entre fatores angiogênicos e não angiogênicos.

Inúmeras situações podem resultar em neovascularização corneana como doenças imunomediadas, infecciosas, tóxicas, traumáticas e nutricionais^{9,10}.

Este estudo comparou a capacidade angiogênica de 2 membranas biológicas (pericárdio e membrana amniótica) após terem sido implantadas na córnea de ratos.

A córnea é considerada como um bom modelo para estudo da angiogênese, por ser transparente e avascular, podendo ser examinada macro e microscopicamente³⁰, pois os vasos neoformados originam-se do limbo corneoescleral, permitindo uma mensuração contínua¹³.

Vários tecidos, neoplásicos ou não, com células ativadas e *pellets* contendo medicamentos ou fatores de crescimento, podem ser introduzidos no interior da microbolsa corneana para avaliar suas atividades angiogênicas em diferentes animais de laboratório como coelho¹⁶, porquinho da Índia²⁷, camundongo² e rato¹³. Neste trabalho utilizamos 2 membranas biológicas (pericárdio e membrana amniótica) que provocaram neovascularização corneana de maneira consistente e reprodutível.

A associação anestésica (ketamina e xilazina) se adequou perfeitamente à metodologia do trabalho apresentando segurança, praticidade, baixo custo e duração adequados.

O rato, como modelo experimental, mostrou vantagens por ser econômico e de fácil manipulação, enquanto que o camundongo requer um consumo de tempo muito maior em microcirurgia¹³.

Instituiu-se a conservação das membranas biológicas (pericárdio e membrana amniótica) em solução de glicerina a 98%, por se caracterizar em um meio de conservação simples, eficiente e de baixo custo. O pioneiro a utilizar este método foi PIGOSSI²⁵ na conservação da dura-máter e na oftalmologia veterinária foi empregado por BARROS et al.¹³; GARCIA et al.¹⁵; BARROS et al.⁴; LAUS et al.²¹; ANDRADE¹, por razões similares.

A microbolsa corneana, desenvolvida por GIMBRONE JÚNIOR et al.¹⁶ em coelhos para testar a ação angiogênica de tecido introduzido no estroma corneano, foi por nós utilizada neste estudo, porém em ratos, o que já havia sido feito por FOURNIER et al.¹³.

Um dia após o implante, notou-se dilatação venular intensa próxima ao limbo e aos 3 dias observou-se vasos neoformados próximo ao limbo e não próximo ao enxerto. A neovascularização próxima ao enxerto foi detectada aos 7 dias do implante e atingiu o grau máximo aos 15 dias, para depois iniciar sua fase de regressão. Em todos os tempos pré-estabelecidos, o pericárdio foi responsável por induzir neovascularização com maior intensidade. Fig. 4.

SUNDERKÖTTER et al.³⁰, PEREIRA²³ e PETRI²⁴ observaram neovascularização profunda após cauterização corneana com nitrato de prata em ratos à partir das primeiras 24 horas e aos 3 dias já se observaram inúmeros brotos vasculares provenientes do plexo corneano. Aos 7 dias de evolução, obtiveram maior densidade vascular. Aos 15 e 30 dias, progressivamente, os vasos neoformados apresentavam-se menores quanto ao número e ao calibre²³. BENELLI et al.⁵ que mantiveram os ratos até 10 dias após a cauterização química e o transplante corneano, observaram aumento progressivo da neovascularização corneana.

Já em camundongos, MUTHUKKARUPPAN e AUERBACH²² observaram que no 2º dia havia uma proeminente vasodilatação na região limbar, imediatamente adjacente ao implante de tecido tumoral e a neovascularização era intensa no 4º dia, aumentando gradativamente até o 10º dia para depois iniciar o processo de regressão.

FOUNIER et al.¹³ concluíram que a neovascularização em ensaios utilizando implantes de *pellets* em microbolsa na córnea de ratos iniciava a regressão no 16º dia. Fato similar foi por nós encontrado, em nosso trabalho após a implantação das membranas biológicas.

No grupo controle, a reação inflamatória induzida pela confecção da microbolsa, foi muito discreta e passageira, com presença de neovascularização e células tipo PMN detectadas até aos 3 dias. Aos 7 dias, o epitélio encontra-se regenerado, com ausência de tecido de granulação, como foi visto nos animais que receberam membranas biológicas no interior do estroma corneano.

A angiogênese está presente em inúmeros processos fisiológicos ou patológicos e o seu entendimento acrescido do seu controle resultaria na obtenção de tratamento efetivo para doenças tais como neoplasias, doenças angiogênicas e rejeição de órgãos ou tecidos transplantados.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos da análise histológica das córneas que receberam implante de pericárdio e membrana amniótica pudemos concluir que:

1. ambas as membranas biológicas induziram angiogênese corneana após terem sido implantadas no interior do estroma em ratos, podendo ser usadas como modelo de angiogênese.

2. a angiogênese induzida pelo pericárdio xenólogo

foi mais intensa que a membrana amniótica xenóloga, quando comparado histopatologicamente

3. a angiogênese induzida pelo pericárdio xenólogo foi mais duradoura que a membrana amniótica xenóloga, quando comparado histopatologicamente.

4. nas córneas implantadas, tanto o pericárdio quanto a membrana amniótica xenólogas, a neovascularização corneana atingiu seu grau máximo aos 15 dias de pós-operatório, para então iniciar seu processo de regressão, sendo mais intensa na presença da membrana amniótica.

SUMMARY

Angiogenesis has been known to participate in several physiological and pathological processes. Experimental models have been utilized to demonstrate its importance. The aim of this study was to establish an angiogenesis model using two biological membranes (pericardium and amniotic membrane) preserved in glycerin. The membranes were implanted in a micropocket in the cornea of 63 rats. The pericardium was implanted into the right cornea and the amniotic into the left cornea of the same animal. The rats were sacrificed at 1, 3, 7, 15, 30 and 60 days after the surgical procedure and the specimens underwent histology examination. Although the pericardium was more effective to induce angiogenesis and for a long period of time when compared to the amniotic membrane, both membranes can be used as an angiogenesis model.

KEY-WORDS: Angiogenesis. Cornea. Biological membranes. Experimental model. Rat

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, A L. **Emprego experimental da cápsula renal de equino (*Equus caballus*, LINNAEUS, 1758), preservada em glicerina, no reparo de ceratectomias superficiais em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758)**. Avaliação clínica e morfológica. Jaboticabal, 1996. 74p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
2. ANDRADE, S.P.; VIEIRA, L.B.G.B.; BAKHLE, Y.S.; PIPER, P.J. Effects of platelet activating factor (PAF) and other vasoconstrictors on model of angiogenesis in the mouse. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 73, p.503-13, 1992.
3. BARROS, P.S.M.; SAFATLE, A.M.V. Reparação cirúrgica da córnea de cães usando pericárdio conservado em glicerina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 13, Gramado, 1990. **Anais**. Gramado: Anclivepa, 1990. p.11.
4. BARROS, P.S.M.; GARCIA, J. A.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; SALLES GOMES, T. L. Aspectos clínicos do uso de membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina nas ceratoplastias penetrantes da córnea de cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 1, Curitiba, 1994. **Anais**. Curitiba: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia, 1994. p. 84.
5. BENELLI, U.; ROSS, J. R.; NARDI, M.; KLINTWORTH, G. K. Corneal neovascularization induced by xenografts or chemical cautery – Inhibition by Cyclosporin A. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.38, n.2, p. 274-82, 1996.
6. BISCHOFF, J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. **Trends in Cell Biology**, v.5, p.60-5, 1995.
7. CAO, Y.; LINDEN, P.; SHIMA, D.; BROWNE, F.; FOLKMAN, J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. **The Journal of Clinical Investigation**, v.98, n.11, p. 2507-11, 1996.
8. CURSIEFEN, C.; MICHAEL, K.; NAUMANN, G. O. H. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. **Cornea**, v.17, n.6, p. 611-3, 1998.
9. DANA, M-R.; SCHAUMBERG, D. A.; KOWAL, V. O.; GOREN, M.B.; RAPUANO, C. J.; LAIBSON, P. R.; COHEN, E. J. Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty. **Cornea**, v.14, n.6, p. 604-9, 1995.
10. EPSTEIN, R. J.; STULTING, R. D.; HENDRICKS, R. L.; HARRIS, D. M. Corneal neovascularization: Pathogenesis and inhibition. **Cornea**, v.6, n.4, p. 250-7, 1987.
11. FIDLER, I. J.; Molecular biology of cancer. In DE VITA JUNIOR, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: principles & practice of oncology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. P. 135-52.
12. FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v.235, p. 442-7, 1987.
13. FOURNIER, G. A.; LUTTY, G. A.; WATT, S.; FENSELAU, A.; PATZ, A. A corneal micropocket assay for angiogenesis in the rat eye. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, v.21, n.2, p. 351-4, 1981.
14. FREDERICK, J. L.; SHIMANUKI, T.; DI ZEREGA, G. S. Initiation of angiogenesis by human follicular fluid. **Science**, v.224, p. 389-90, 1984.
15. GARCIA, J. A.; BARROS, P. S. M.; FERREIRA, A. L.; SAFATLE, A. M. V. Implante de peritônio homólogo conservado após ceratectomia lamelar em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 15, Rio de Janeiro, 1993. **Anais**. Rio de Janeiro: Anclivepa, 1993, p. 74.
16. GIMBRONE JÚNIOR, M. A.; COTRAN, R. S.; LEAPMAN, S. B.; FOLKMAN, J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using rabbit cornea. **Journal of the National Cancer Institute**, v.52, p. 413-27, 1974.

SAFATLE, A.M.V.; BARROS, P.S.M.; MALUCELLI, B.E.; GUERRA, J.F. Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.4, p.189-195, 2002.

17. GUIDUGLI-NETO, J. **Angiogênese: análise dos modelos experimentais**. São Paulo: s.n., 1997. 58p. (Apostila).
18. HUNT, T. K.; KNIGHTON, D. R.; THAKRAL, K. K.; GOODSON III, W. H.; ANDREWS, W. S. Studies on inflammation and wound healing: stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. **Surgery**, v.96, n.1, p. 48-54, 1984.
19. KENYON, B. M.; VOEST, E. E.; CHEN, C. C.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J.; D'Amato, R. J. A model of angiogenesis in mouse cornea. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.37, n.8, p. 1625-32, 1996.
20. KLAUBER, N.; BROWNE, F.; ANAND-APTE, B.; D'AMATO, R. J. New activity of spironolactone: Inhibition of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. **Circulation**, v.94, n.10, p. 2566-71, 1996.
21. LAUS, J. L. **Emprego da escama de sardinha (*Sardinella brasiliensis* – STEIDACHNER, 1859), conservada em glicerina, como sucedâneo de córneas no reparo de ceratectomias superficiais**. Estudo experimental em cães. (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758). Jaboticabal, 1994. 71p. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
22. MUTHUKKARUPPAN, V.; AUERBACH, R. Angiogenesis in the mouse cornea. **Science**, v.205, p. 1416-8, 1979.
23. PEREIRA, E. R. **Influência nervosa e humoral na evolução de vasos neoformados na córnea de ratos**. São Paulo, 1996. 111p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
24. PETRI, G. **Influência da aplicação tópica da proteína ligante de cálcio MRP-14 na evolução da neovascularização induzida na córnea de ratos**. São Paulo, 1997. 62p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
25. PIGOSSI, N. A. **A glicerina na conservação de dura-máter**. Estudo experimental. São Paulo, 1967. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
26. POBER, J. S.; COTRAN, R. S. Cytokines and endothelial cell biology. **Physiological Reviews**, v.70, n.2, p. 427-51, 1990.
27. POLVERINI, P. J.; COTRAN, R.; S.; GIMBRONE Júnior, M. A.; UNANUE, E. R. Activated macrophages induce vascular proliferation. **Nature**, v.269, n.27, p. 804-6, 1977.
28. REHANY, U.; WAISMAN, M. Suppression of corneal allograft rejection by systemic Cyclosporine-A in heavily vascularized rabbit corneas following alkali burns. **Cornea**, v.13, n.5, p. 447-53, 1994.
29. STOLTZ, R. A.; CONNERS, M. S.; GERRITSEN, M. E.; ABRAHAM, N. G.; LANIADO-SCHWARTZMAN, M. Direct stimulation of limbal microvessel endothelial cell proliferation and capillary formation *in vitro* by a corneal-derived eicosanoid. **American Journal of Pathology**, v.148, n.1, p. 129-39, 1996.
30. SUNDERKÖTTER, C.; BEIL, W.; ROTH, J.; SORG, C. Cellular events associated with inflammatory angiogenesis in the mouse cornea. **American Journal of Pathology**, v.138, n.4, p. 931-39, 1991.

Recebido para publicação: 17/10/2001

Aprovado para publicação: 21/05/2002