



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2014/2015

Mariana Crespo Garcia Rodrigues
Neovascularização da Córnea – Perda de um privilégio

março, 2015

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mariana Crespo Garcia Rodrigues
Neovascularização da Córnea – Perda de um privilégio

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Oftalmologia
Tipologia: Monografia

Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Dr Luís Pedro Caldas Figueira

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:
Acta Oftalmológica

março, 2015

FMUP

Eu, Náiana Ceyra Garcia Rodriguez, abaixo assinado, nº mecanográfico 200805629, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 26/03/2015

Assinatura conforme cartão de identificação:

Náiana Ceyra Garcia Rodriguez

NOME

Mariana Crespo Garcia Rodrigues

CARTÃO DE CIDADÃO OU PASSAPORTE (se estrangeiro)

E-MAIL

TELEFONE OU TELEMÓVEL

13780645

mariana_cgr@hotmail.com

926171256

NÚMERO DE ESTUDANTE

DATA DE CONCLUSÃO

200805629

Março, 2015

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Oftalmologia

TÍTULO DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA (riscar o que não interessa)

Neovascularização da Córnea – Perda de um privilégio

ORIENTADOR

Dr Luís Pedro Caldas Figueira

COORIENTADOR (se aplicável)

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação/Monografia (riscar o que não interessa) para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projectos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 26/03/2015

Assinatura conforme cartão de identificação: Mariana Crespo Garcia Rodrigues

Aos meus pais, por tudo.

Neovascularização da Córnea – Perda de um privilégio

Mariana Rodrigues, Luís Figueira

Resumo

A avascularidade, enquanto fator determinante da transparência corneana, é imprescindível para a manutenção de uma acuidade visual ótima. A capacidade da córnea se manter desprovida de vasculatura sanguínea e linfática - o privilégio (linf)angiogénico corneano - resulta de um processo ativo de equilíbrio entre diversos fatores promotores e inibidores da angiogénese. Na presença de insultos como hipóxia, infeção ou trauma, esse equilíbrio é quebrado, e a córnea é invadida por neovasos patológicos. A neovascularização da córnea, para além de comprometer severamente a visão, aumenta o risco de rejeição do enxerto após uma queratoplastia subsequente.

A compreensão dos princípios subjacentes à manutenção do privilégio angiogénico, assim como da fisiopatogenia da neovascularização da córnea, torna-se pertinente para um melhor entendimento das estratégias utilizadas na prevenção e terapêutica desta patologia. Nesta revisão são assim discutidos, quer os mecanismos básicos envolvidos no privilégio angiogénico da córnea, quer as diferentes etiologias, manifestações clínicas e patogenia da neovascularização. Os principais métodos terapêuticos atuais e perspectivas futuras para a abordagem desta doença são também analisados.

Abstract

As one of the mainstays of corneal transparency, avascularity is essential for obtaining optimal visual acuity. Cornea's ability to keep devoid of blood and lymphatic vessels – corneal (lymph)angiogenic privilege – is due to an active balance process between several angiogenesis promoter and inhibitor factors. In the presence of insults like hypoxia, infection or trauma, the balance is lost, and pathologic neovessels grow into the cornea. Corneal neovascularization not only causes visual impairment, but also increases the risk of graft rejection after a subsequent keratoplasty.

A comprehension of the underlying principles of both angiogenic privilege maintenance and corneal neovascularization pathogenesis allows the appreciation of preventive and therapeutic strategies used in corneal angiogenesis. Therefore, this review considers the basic mechanisms implied in corneal angiogenic privilege, as well as the different etiologies, clinical manifestations and pathogenesis subjacent to corneal neovascularization. Main current therapeutic methods and future prospects in the management of this disease are also analyzed.

Palavras-chave: córnea, angiogénese, neovascularização, avascularidade, terapêutica

Keywords: cornea, angiogenesis, neovascularization, avascularity, treatment

Introdução

A vascularização é um processo vital para a sobrevivência e homeostasia da maioria dos tecidos, no entanto, alguns tecidos, de modo a assegurarem um funcionamento adequado, são desprovidos de vasos sanguíneos e linfáticos. Entre estes incluem-se a cartilagem, as válvulas cardíacas, o humor vítreo, o cristalino e a córnea.^(1, 2)

Com aproximadamente 1mm de espessura na periferia e 0.5mm no centro, a córnea é constituída por uma camada externa de epitélio escamoso estratificado não queratinizado, um estroma de colagénio com queratócitos e, a rodear a câmara anterior, um endotélio cubóide.⁽³⁾ A córnea, para além de desempenhar a função de barreira de proteção dos tecidos intraoculares, funciona essencialmente como elemento de transmissão e refração da luz incidente. Para uma transmissão eficiente da luz é fundamental a manutenção da transparência da córnea, processo no qual a avascularidade representa um fator chave, sendo a córnea um tecido de natureza avascular em todos os estadios do seu desenvolvimento.^(3, 4) Perante a ausência de uma vasculatura própria, a córnea é nutrida e oxigenada a partir dos tecidos adjacentes: o filme lacrimal, o humor aquoso na câmara anterior e o complexo capilar pericorneano localizado no limbo.⁽⁵⁾ Esta capacidade de, na ausência de patologia, a córnea ser desprovida e ter a capacidade de inibir a formação de vasos sanguíneos e linfáticos é denominada “privilégio (linf)angiogénico da córnea”. Tal designação, que evidencia a atipia desta característica corneana, surge em paralelismo com o “privilégio imune da córnea”, a “proteção” que esta goza contra a rejeição de enxertos de tecido por parte do sistema imunitário.^(3, 4, 6)

O privilégio angiogénico da córnea resulta de um delicado equilíbrio entre fatores inibidores e promotores da angiogénese (factores pro- e anti-angiogénicos) no epitélio corneano.⁽⁷⁾ Em determinados processos patológicos como a hipóxia, inflamação, infeção ou trauma, o equilíbrio entre estes factores é perturbado⁽⁸⁾,

levando à perda do privilégio angiogénico com a conseqüente formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos, a neovascularização da córnea (NVK).

A NVK representa uma causa importante de diminuição da acuidade visual e distúrbios da visão, podendo conduzir à cegueira.^(4, 9) O crescimento anormal de vasos na córnea modifica as características anatómicas da mesma e produz *esclerização* das camadas, e mesmo conjuntivização da superfície, diminuindo a transparência de que estas são dotadas⁽¹⁰⁾ e causando assim distúrbios no transporte de luz. Esses novos vasos são desprovidos de membrana basal e pericitos e deste modo muito frágeis e suscetíveis a fugas de conteúdo.⁽⁵⁾ A hemorragia resultante leva a um bloqueio ainda maior do transporte da luz incidente. A acumulação de fluidos, proteínas e lipídeos resultam em edema e exsudados, que vão também contribuir para a diminuição da transparência da córnea.⁽⁵⁾ Para além de reduzir a acuidade visual, a vascularização introduz na córnea células do sistema imunitário, interferindo com o privilégio imune e aumentando significativamente a taxa de rejeição do enxerto num transplante subsequente.^(6, 11)

A incidência da NVK ronda os 1.4 milhões de doentes por ano nos EUA, sendo que 12% destes casos estão associados a perda da acuidade visual.^(10, 12) A NVK associa-se às principais causas de cegueira corneana no mundo (tracoma) e nos países industrializados (queratite herpética).⁽¹⁰⁾ Às diferentes etiologias da NVK é comum a quebra do privilégio angiogénico⁽¹³⁾ tornando-se imperativo identificar os diversos mecanismos moleculares que possam ser utilizados como alvo na terapêutica, prevenção ou atraso da progressão desta patologia.^(4, 10, 11) A angiogénese corneana pode conduzir a uma perda irreversível da acuidade visual, o que implica uma abordagem terapêutica precoce e agressiva.

Esta revisão tem assim por objectivo a discussão dos mecanismos implicados na manutenção da avascularidade corneana e na fisiopatologia da NVK, bem como das principais abordagens terapêuticas atuais da NVK na prática clínica

Privilégio Angiogénico - um processo ativo de regulação

Na formação do sistema vascular, durante o desenvolvimento embrionário e remodelação vascular pós-natal, estão presentes dois mecanismos, a vasculogénese e a angiogénese.^(5, 12)

Na vasculogénese o processo de formação de vasos sanguíneos envolve angioblastos, células de origem mesodérmica, originadas a partir dos hemangioblastos.⁽¹⁴⁾ Os angioblastos agregam-se e diferenciam-se em células endoteliais que se vão alinhar em torno de um lúmen contendo percursores das células hematopoiéticas,⁽⁷⁾ dando assim origem aos plexos capilares primários. Posteriormente ocorre a remodelação e extensão da rede primitiva com a formação de novos vasos a partir dos vasos pré-existentes, através do processo de angiogénese.⁽⁵⁾ O aparecimento de novos vasos implica o alargamento de contactos célula-célula entre as células endoteliais, degradação da matriz extracelular, maturação funcional de células endoteliais e recrutamento de células musculares lisas ou pericitos.⁽¹⁵⁾ Enquanto a vasculogénese predomina no período embrionário, onde adquire um papel major na formação de novos vasos na maioria dos tecidos,^(5, 16) a angiogénese ocorre também no adulto.

A angiogénese é, na idade adulta, um processo altamente regulado, ativado/inibido por moléculas angiogénicas/anti-angiogénicas específicas e que intervém em funções fisiológicas como cicatrização de lesões, reparação óssea, ciclo uterino ou maturação placentária.^(8, 17) É o equilíbrio entre estes factores inibidores e estimulantes que permite que a vasculatura capilar se mantenha normalmente quiescente.⁽¹⁸⁾ Por outro lado a angiogénese está também subjacente ao crescimento patológico de novos vasos quando esse equilíbrio é perturbado, como acontece no crescimento e metastização tumoral, retinopatia diabética ou na NVK.^(5, 19, 20)

O privilégio angiogénico da córnea implica, não um estado quiescente, mas um processo ativo de manutenção do equilíbrio que envolve diversos mecanismos moleculares.^(3, 21) Agressões como o trauma, infeções, ou patologias degenerativas, promovem *upregulation* de factores angiogénicos que, de modo a que o estado avascular da mesma seja mantido, tem de ser contrabalançada através da produção de factores antiangiogénicos pelo epitélio corneano. A formação de neovasos corneanos vai assim ser consequência de um desequilíbrio em favor da angiogénese, causado por *upregulation* crónica e persistente da resposta angiogénica que resulta, por sua vez, de uma reacção tecidual local inapropriada ao insulto primário. Esta *upregulation* dos factores angiogénicos é acompanhada por uma *downregulation* dos factores anti-angiogénicos.⁽⁶⁾

Foi igualmente demonstrado que o limbo da córnea desempenha uma contribuição na prevenção da neovascularização (ainda que por mecanismos pouco conhecidos até à data).^(6, 22)

Factores angiogénicos na córnea

- ***Vascular endothelium growth factor***

O *vascular endothelium growth factor* (VEGF), cuja família compreende o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D, é o mais potente dos factores angiogénicos e vasculogénicos.⁽¹⁰⁾ Os membros da família VEGF, inicialmente identificados como estimuladores da permeabilidade vascular, promovem vários passos no processo de angiogénese, incluindo recrutamento dos percursoros, proliferação e migração de células endoteliais vasculares, e inibição da apoptose das mesmas.⁽¹³⁾ Na córnea, a expressão de VEGF aumenta marcadamente com a hipóxia ou durante a inflamação aguda,⁽²³⁾ sendo este segregado por macrófagos, células T, pericitos e células do músculo liso.⁽⁴⁾

O VEGF-A é o factor principal na promoção da hemangiogénese na córnea. Este liga-se a receptores tipo tirosina-cínase VEGFR-1 (sFlt-1) e VEGFR-2 (sFlk-2).⁽²⁴⁾ Atualmente a terapia anti VEGF-A constitui uma das bases para o tratamento da neovascularização patológica.⁽³⁾

O VEGF-C e o VEGF-D, que se ligam ao receptor VEGFR3, estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento de endotélio linfático.⁽³⁾

- ***basic fibroblast growth factor***

O *basic fibroblast growth factor* (bFGF) pertence à família dos *fibroblast growth factors* (FGFs), que engloba 23 peptídeos de ligação à heparina que estão envolvidos na diferenciação celular, angiogénese, mitogénese e reparação de lesões.⁽³⁾ O bFGF-1 e o bFGF-2 são expressos na córnea e têm sido exhaustivamente estudados na NVK. O bFGF-2 é suprarregulado após uma lesão enquanto o bFGF-1 é expresso na córnea normal.⁽³⁾ O FGF liga-se à membrana basal em córneas neovascularizadas, acreditando-se assim que a membrana

basal corneana sirva como reservatório de bFGF, “sequestrando-o” num mecanismo de controlo angiogénico⁽²⁵⁾

A função angiogénica do bFGF deve-se à indução da proliferação e migração de células endoteliais através da ativação da produção de VEGF,⁽⁷⁾ e de metaloproteinases da matriz (MMPs) que degradam a matriz extracelular “traçando” caminho para a migração celular.⁽⁵⁾ O bFGF também promove a linfangiogénese por *upregulation* da expressão de VEGF C e D.⁽³⁾

- ***Platelet-derived growth factor***

O *platelet-derived growth factor* (PDGF) suporta a maturação vascular ao induzir o recrutamento de pericitos.⁽²⁶⁾

Metaloproteinases da matriz – um papel ambíguo na NVK

Metaloproteinases da matriz (MMPs) são um grupo de endopeptidases que se ligam ao zinco, e que têm a capacidade de, sob diferentes condições, participar tanto na remodelação da matriz extracelular e angiogénese, como na manutenção da avascularidade.⁽¹⁰⁾ Das 25 MMPs conhecidas, pelos menos 15 foram identificadas na córnea, incluindo as colagenases I e III (MMP-1 e MMP-13 respectivamente), gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9), ou a MMP do tipo membranar (MMP-14).⁽³⁾

Se inicialmente se pensava que atuavam apenas na degradação da matriz extracelular, agora é sabido que a proteólise mediada por MMPs está envolvida em diversas funções fisiológicas, tais como:⁽²⁷⁾ conversão de moléculas estruturais em moléculas de sinalização (conseguem gerar endostatina ou angiostatina - factores anti-angiogénicos - através da clivagem do domínio NC1 do colagénio XVIII ou do plasminogénio, respectivamente); quimiotaxia; alterações na arquitetura tecidual ou ativação de moléculas de sinalização celular (como o TNF- α). A função ambígua das MMPs é explicada pela sua capacidade de funcionarem como promotoras da angiogénese ao degradarem a matriz extra-celular, permitindo a invasão tecidual por células endoteliais, e simultaneamente libertarem factores anti-angiogénicos nas células epiteliais corneanas a partir da degradação proteolítica dos seus precursores.⁽²¹⁾

Factores anti-angiogénicos na córnea

- **Trombospondinas (TSP-1 e TSP-2)**

As trombospondinas (TSP) são uma família de glicoproteínas de secreção que foram implicadas na supressão da angiogénese, após se ter verificado que a TSP-1 e TSP-3 estavam presentes na cartilagem avascular, mas ausentes na hipertrófica, que se torna vascularizada.⁽²⁸⁾ Dentro desta família a TSP-1 e a TSP-2 são expressas na córnea normal e na íris,⁽²⁹⁾ e foram associadas à inibição da NVK induzida por inflamação em modelos animais.^(30, 31) A TSP-1 inibe a migração células endoteliais através da ativação do receptor CD36 na superfície dos macrófagos, que regula negativamente a secreção de VEGF. Esta glicoproteína vai também interferir com a sobrevivência das células endoteliais através de efeitos indiretos na mobilização de fatores de crescimento.^(32, 33)

- **Endostatina**

A endostatina é um fragmento de 20 kDa que resulta da clivagem proteolítica do colagénio XVIII por MMPs, catepsina L e elastase.⁽³⁴⁾ O colagénio XVIII está, no olho, presente na córnea, retina e cápsula do cristalino.⁽²¹⁾ A endostatina causa paragem do ciclo celular em G1 e inibe a atividade do VEGF-A ao bloquear as vias de sinalização envolvidas na atividade mitogénica que este induz em células endoteliais vasculares.⁽³⁵⁾ Ao provocar a *downregulation* do VEGF-C e regular a proliferação e migração de células linfáticas, vai também causar um bloqueio da linfangiogénese.⁽³⁶⁾ Esta molécula bloqueia também a atividade da caspase 3, aumentando a apoptose de células vasculares endoteliais.⁽³⁷⁾

- **Angiostatina**

A angiostatina é um fragmento proteolítico de 38 kDa, produzido a partir do plasminogénio através da ação das MMPs -2, -3, -7, -9 e -12.⁽⁴⁾ A angiostatina encontra na córnea um dos seus pontos centrais de produção. O efeito anti-angiogénico desta proteína relaciona-se com a capacidade de induzir a paragem do ciclo celular em G2, regulando negativamente a migração e proliferação de células endoteliais, e de causar apoptose das mesmas.^(3, 10) Foi demonstrado que inibe a NVK causada por trauma em modelos animais.⁽³⁸⁾

- **Pigment epithelium-derived factor**

O *pigment epithelium-derived factor* (PEDF) é uma proteína pertencente à superfamília das serpinas, identificada no filme lacrimal,⁽³⁹⁾ íris, epitélio pigmentado da retina, e na córnea.⁽³⁰⁾ Para além de funcionar como anti-neurotrófico e anti-tumorigénico, é um potente anti-angiogénico, com um papel essencial na redução da NVK induzida pelo bFGF.⁽³¹⁾

- **Soluble VEGF receptor-1 e VEGF receptor-3**

O epitélio corneano expressa o Receptor solúvel VEGF-1 (sVEGFR-1 ou sflt-1) e o Receptor ectópico VEGF-3 (VEGFR-3) que atuam como “armadilhas” fisiológicas para o VEGF-A e para os VEGF-C e VEGF-D (respectivamente) sequestrando-o, e controlando desta forma as suas propriedades linfangiogénicas.⁽⁴⁰⁾

Ambati et al⁽⁴¹⁾ demonstrou que o sVEGFR-1 é expresso nas córneas normais, e que a sua expressão está diminuída em córneas neovascularizadas, ocorrendo nestas uma notável redução da ligação do VEGF-A ao sVEGFR-1. A existência de “armadilhas” para factores angiogénicos e inflamatórios na córnea

saudável corrobora assim a hipótese de que o epitélio corneano intato tem efeitos antiangiogénicos.⁽⁴²⁾

A barreira límbica no privilégio angiogénico corneano

O limbo consiste numa zona de fronteira onde a conjuntiva e a esclerótica opaca, transitam para a córnea transparente.⁽⁴³⁾ Este não representa contudo, uma estrutura anatómica clássica com limites definidos sendo, na sua descrição mais abrangente, determinado como a zona entre o término das membrana de Bowman e de Descemet, e a extremidade posterior do canal de Schlemm.⁽³⁾

A função do limbo tem sido debatida desde meados do século XIX,⁽²¹⁾ e só na década de 70 do século XX se começou a averiguar o papel do mesmo na renovação do epitélio corneano.⁽⁴⁴⁾ O epitélio límbico partilha algumas características com o epitélio da córnea, sendo ambos epitélios escamosos, estratificados e não queratinizados, cujas junções celulares apresentam especializações basais e apicais semelhantes.⁽⁴⁵⁾ Admite-se que seja na camada basal do limbo que estão situadas as células estaminais epiteliais responsáveis por renovar o epitélio corneano danificado.⁽⁴⁶⁾ Para além do papel na renovação do epitélio corneano o limbo funciona como fornecedor de oxigénio e recipiente de produtos de excreção.⁽⁶⁾ Acredita-se também que o limbo represente um papel fundamental na manutenção da avascularidade corneana e na prevenção da NVK.⁽²²⁾ Este conceito tem por base o grande aumento da NVK que se observa quando ocorre danificação da barreira límbica⁽⁴⁷⁾ e a diminuição substancial da NVK após o transplante de células límbicas.⁽⁴⁸⁾ Apesar do papel do limbo na manutenção da avascularidade corneana ser bem aceite, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares subjacentes a este efeito anti-angiogénico.⁽³⁾ A hipótese da barreira límbica sugere que a constante renovação das células epiteliais corneanas pelo limbo atua como barreira física na prevenção do crescimento vascular para a córnea,⁽²¹⁾ sendo atualmente umas das

mais bem aceites para explicar o mecanismo subjacente ao efeito anti-angiogénico do qual este é detentor. Azar et al 2006⁽²¹⁾ observou contudo que a remoção de metade do limbo em modelos animais leva à NVK no lado oposto da córnea, onde o limbo se encontra intacto. Esta demonstração vem questionar o papel do limbo enquanto barreira física para a NVK, sugerindo antes que a manutenção desse privilégio dependerá mais do efeito cumulativo de uma massa celular crítica de células límbicas. Estudos adicionais serão fundamentais no futuro de modo a melhor esclarecer o papel do limbo no privilégio angiogénico da córnea ⁽³⁾

Etiologia da Neovascularização da Córnea

A NVK pode ser uma resposta a uma multiplicidade de estímulos infecciosos, imunológicos degenerativos, traumáticos ou anóxicos que perturbam o privilégio angiogénico da córnea.

As infeções constituem atualmente a principal causa de NVK, sendo que o tracoma, uma queratoconjuntivite crónica causada pela *Chlamydia trachomatis*, representa também a primeira causa de cegueira no mundo.⁽⁴⁹⁾ A NVK é de igual modo uma manifestação possível em infeções causadas por outras bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus Influenzae*; espécies de *Pseudomonas* ou na sífilis, provocada pelo *Treponema pallidum pallidum*. Patógenos víricos, como *Herpes Zóster* ou *Herpes Simplex*, fúngicos como espécies de *Candida* ou *Aspergillus* e nemátodos como *Onchocerca volvulus*, podem também conduzir a NVK.⁽⁶⁾

Patologias auto-imunes como o síndrome de Sjögren ou degenerativas como a degenerescência marginal de Terrien ou a deficiência de células estaminais da barreira límbica podem igualmente contribuir para o processo de NVK.⁽³⁾

O trauma que pode, por exemplo, ser resultante de queimaduras químicas representa uma causa adicional de NVK. Quer substâncias ácidas quer alcalinas podem causar consideráveis danos na córnea, no entanto, a severidade dos mesmos é maior quando a queimadura é causada por alcalinos, dada maior rapidez com que penetram na córnea.⁽¹²⁾

O uso de lentes de contacto, cuja popularidade tem vindo a aumentar nas últimas décadas, tornou-se noutra das principais causas de NVK.⁽¹²⁾ As lentes de contacto estimulam a neovascularização, quer causando irritação mecânica do sulco límbico e erosão epitelial, quer através da indução de hipóxia e hipercapnia, o que conduz a inflamação límbica e libertação de mediadores da angiogénese.^(50, 51)

É sabido que a NVK aumenta a probabilidade de rejeição do enxerto na queratoplastia, porém o inverso também acontece, sendo a NVK uma consequência em 50% dos transplantes cujo leito receptor era previamente avascular.⁽³⁾

Manifestações clínicas da Neovascularização da Córnea

A multiplicidade de “agressões” que está na origem da NVK vai também traduzir-se em diferentes padrões de neovascularização. Estes podem ser agrupados segundo a profundidade e localização dos neovasos, em três entidades principais: NV superficial, NV em *pannus* vascular e NV estromal.⁽⁵⁾

Na NV superficial vasos tortuosos brotam da arcada marginal superficial e estendem-se sob o epitélio corneano, podendo atingir a porção mais superficial do estroma. A NV superficial resulta de uma irritação superficial crónica, surgindo nos doentes que usam lentes de contacto ou após trauma da córnea, queimaduras químicas ou cirurgias.⁽⁵⁾

No *pannus* vascular, vasos e tecido conjuntivo crescem do limbo para a periferia da córnea, estando de igual modo associada a distúrbios da superfície ocular. Este padrão é característico do tracoma.⁽¹¹⁾

A NV estromal, pode ser observada a um nível mais profundo, em qualquer nível do estroma desde a membrana de Bowman até à membrana de Descemet, como vasos rectilíneos que arborizam e que frequentemente se fazem acompanhar de fibras nervosas. Este padrão de NV pode ser resultado de patologias como a queratite estromal, esclerite, tuberculose, sífilis ou de queimaduras alcalinas.^(5, 12)

A medição da extensão e profundidade dos vasos neoformados, e o conhecimento da associação entre os diversos padrões e causas de NV, representa assim uma útil ferramenta de diagnóstico de patologias da córnea.

Patogenia da Neovascularização da Córnea

O processo de vascularização que se inicia com a ruptura do equilíbrio avascular corneano em favor da angiogénese pode ser dividido em várias etapas. Após a lesão precursora, inicia-se uma fase latente caracterizada por dilatação dos vasos pericorneanos, recrutamento de leucócitos, e libertação de factores de crescimento pela córnea, que vão estimular células endoteliais desses mesmos vasos. Com a ativação das células endoteliais ocorre retração das junções celulares, que promove um aumento da permeabilidade vascular, e degradação da matriz extracelular por MMPs, propiciando a migração dessas células para a córnea.⁽⁵²⁾ A esta fase segue-se a germinação de novos vasos e anastomose, com formação de uma lâmina basal de suporte em torno dos mesmos, e uma fase de regressão capilar e maturação vascular.⁽⁵³⁾

Sob condições inflamatórias os macrófagos desempenham um papel essencial no processo de invasão de células endoteliais para a córnea.⁽⁵³⁾ Estes libertam factores pro-angiogénese como o bFGF ou o VEGF que estimulam a produção e migração de células endoteliais. Os macrófagos vão ainda contribuir para intensificar a inflamação através do recrutamento adicional de macrófagos.⁽⁵⁴⁾

Sob condições de hipóxia e/ou hipercapnia, como acontece com o uso excessivo de lentes de contacto, a neovascularização é induzida numa tentativa de fornecer oxigénio à córnea. Factores como o PEDF que em condições normóxicas actuam como anti-angiogénicos, são na hipóxia infra-regulados, criando um ambiente propício à NVK.⁽³¹⁾ É induzida a formação de HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) que se liga ao HRE (hypoxia response element) ativando a transcrição de genes VEGF e estimulando assim a angiogénese.^(55, 56) A hipóxia vai de igual modo causar NVK através da estimulação de marcadores inflamatórios como a IL1 β .⁽⁵⁷⁾

Os vasos neoformados por este processo patológico de angiogénese são imaturos e desprovidos de integridade estrutural. A permeabilidade vascular

aumentada vai-se traduzir em edema crónico da córnea, exsudação de lipídeos, inflamação adicional e lesões cicatriciais e, conseqüentemente, numa diminuição da transparência corneana, que pode perturbar severamente a acuidade visual.⁽⁵⁸⁾

Principais abordagens terapêuticas na Neovascularização da Córnea

A escolha de um tratamento adequado para a NVK pode tornar-se num processo desafiante. Numerosos tratamentos têm sido testados para os vários modelos de NVK,⁽³⁾ estando atualmente disponíveis diversas opções médicas e cirúrgicas, que apresentam níveis variados de sucesso.

Para além de tratar a causa subjacente, a terapêutica ideal da NVK visaria atingir não apenas a destruição dos neovasos corneanos, como também restaurar a zona de privilégio angiogénico, prevenindo uma futura neovascularização.⁽¹⁰⁾ Deste modo, as abordagens terapêuticas da NVK podem de uma forma geral ser agrupadas em três categorias: anti-angiogénicas/angiostáticas, que visam suspender o crescimento de novos vasos; angio-regressivas, que causam a regressão dos vasos patológicos já existentes; angio-oclusivas, que causam uma oclusão funcional dos vasos sanguíneos.⁽⁵⁹⁾

O método de escolha para o tratamento dos neovasos patológicos depende do estado de maturação dos mesmos.^(7, 53) Vasos em crescimento ativo, imaturos, são ainda dependentes da sinalização por factores angiogénicos (como o VEGF), podendo a regressão destes vasos e o bloqueio da perpetuação da angiogénese ser obtidas através da remoção desses factores de crescimento.⁽⁶⁰⁾ A indução da regressão de vasos maduros, cobertos por pericitos e dependentes de forma não significativa da sinalização angiogénica é um processo mais complexo. Nesta situação, a abordagem terapêutica teria de aliar aos métodos anti-angiogénicos, estratégias físicas de oclusão dos vasos. Os métodos angio-oclusivos são ainda úteis para sustentar o extravasamento do conteúdo dos neovasos para a córnea ou na prevenção de hemorragias intra-operatórias durante a queratoplastia.⁽⁵⁹⁾

Ao contrário do que acontece em relação aos vasos sanguíneos, os mecanismos que regulam a manutenção dos capilares linfáticos são ainda pouco

conhecidos. Acredita-se que esta poderá passar pelo bloqueio da sinalização de VEGF-C.⁽⁵³⁾

As indicações atuais para a terapêutica da NVK incluem: queratite infecciosa, patologias inflamatórias (como a conjuntivite atópica, rosácea ou síndrome de Stevens-Johnson); neovascularização agressiva no pterígio recorrente; NV em doentes com perda de função da barreira límbica (como a deficiência de células da barreira límbica); NVK causada por glaucoma neovascular; queimaduras córneas e outras lesões e condicionamento pré-operatório e prevenção pós operatória da rejeição de enxertos no transplante corneano.⁽⁶¹⁾

A. Vasos corneanos em fase de crescimento ativo

Terapêutica Anti-inflamatória

Os agentes anti-inflamatórios representam há muito tempo a base da terapêutica convencional de supressão de vasos que proliferam ativamente na NVK.⁽⁶²⁾

Desde a descoberta dos efeitos anti-angiogénicos dos esteróides em 1950, vários agentes foram testados para a inibição da NVK. A lista de esteróides utilizados convencionalmente inclui a hidrocortisona, dexametasona, metilprednisolona, prednisolona, assim como o acetonido de triancinolona.^(10, 57, 62) Os efeitos anti-angiogénicos dos esteróides são essencialmente secundários à sua ação anti-inflamatória. Estes incluem a inibição da quimiotaxia celular, modulação da atividade proteolítica das células endoteliais vasculares que precede a formação de neovasos, e inibição de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-1 ou IL-6). Para além disso os esteróides também inibem a produção de prostaglandinas (PGs) que são pro-angiogénicas e regulam a produção de VEGF.⁽⁶²⁾ Apesar de serem utilizados com sucesso há vários anos para o tratamento da NVK de etiologia inflamatória, a sua eficácia na NVK não inflamatória é limitada, e o seu uso a longo prazo pode resultar em efeitos oculares severos, nomeadamente o desenvolvimento de glaucoma ou cataratas e o aumento do risco de infeções.⁽⁶³⁾

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), que possuem uma eficácia similar à dos esteróides, sem contudo partilharem dos mesmos efeitos secundários, têm também sido usados na terapêutica da NVK. Estes inibem a enzima ciclooxigenase (COX), que converte o ácido araquidónico em PGs. Durante a angiogénese, a expressão da isoforma COX-2 é induzida nas células endoteliais dos neovasos. AINEs como a indometacina, flurbiprofeno, cetrolac ou diclofenac demonstram inibir a angiogénese, no entanto, os efeitos potenciais secundários são muito variáveis e foram descritas complicações como ulceração da córnea. Os

AINEs não são utilizados como primeira linha na supressão da NVK, mas podem, em conjunto com outras terapias, melhorar o outcome do doente.⁽⁶²⁾

Várias outras moléculas anti-inflamatórias demonstraram possuir efeito angiogénico, das quais são exemplos a ciclosporina A,⁽⁶²⁾ a angiostatina,⁽⁶⁴⁾ ou a talidomida.⁽⁶⁵⁾

Inibição do VEGF

É sabido que o VEGF é um indutor *major* das vias da angiogénese, o que levou a que terapêuticas anti-angiogénicas que têm como alvo as isoformas VEGF ou moléculas relacionadas com a via VEGF, se tenham vindo a estabelecer como o “*gold standard*” no tratamento da NVK. Nas terapias anti-VEGF os agentes terapêuticos podem ser administrados em gotas oculares tópicas, injeções subconjuntivais, injeções intra-estromais corneanas e injeções intravítreas.⁽⁶⁶⁾

Atualmente, três anticorpos anti-VEGF têm sido utilizados para a terapêutica da NVK. O bevacizumab (Avastin; Genentech/Roche) é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante que reconhece todas as isoformas de VEGF e inibe a interação VEGF/VEGF-R.⁽⁶⁶⁾ Foi inicialmente aprovado pela FDA para o tratamento do carcinoma colo-rectal metastático, mas também se mostrou eficaz no tratamento da degenerescência macular da idade (DMI).⁽³⁾ Vários estudos experimentais em modelos animais e humanos demonstraram que o bevacizumab causa uma redução significativa dos parâmetros que refletem a NVK.⁽⁶⁷⁾ Este revelou-se mais eficaz em vasos neoformados do que em vasos maduros, estabelecidos.⁽⁶²⁾ O ranibizumab (Lucentis; Genentech/Roche) resulta do fragmento Fab do mesmo anticorpo utilizado para produzir o bevacizumab, ligando-se ao VEGF-A com maior afinidade.⁽⁶⁶⁾ Esta molécula tem revelado resultados promissores no tratamento da NVK na queratite por Herpes Simplex, pterígio recorrente, e síndrome de Steven Johnson por via tópica ou injeção subconjuntival.⁽³⁾ O pegaptanib sódico (Macugen;

EyeTech, Inc) foi o primeiro agente anti-VEGF aprovado para a neovascularização associada à DMI e liga-se apenas à isoforma VEGF165, tendo uma eficácia mais limitada comparativamente ao bevacizumab e ranibizumab.^(66, 68)

Recentemente demonstrou-se que tanto o bevacizumab como o ranibizumab bloqueiam também a linfangiogênese, atuando quer diretamente no epitélio linfático, quer indiretamente através da inibição do recrutamento de macrófagos. Estes compostos poderão desta forma ter interesse na prevenção da rejeição imunológica de enxertos após uma queratoplastia penetrante, onde o componente linfangiogénico é um dos responsáveis pelo processo de rejeição.^(56, 69)

Outras formas de terapêutica anti-VEGF tem vindo a ser alvo de estudos, das quais são exemplos:

- **VEGF trap**, um receptor solúvel criado através da combinação do segundo domínio da imunoglobulina do VEGFR-1 e do terceiro domínio da imunoglobulina do VEGFR-2 com um fragmento Fc de uma Imunoglobulina G1 humana.⁽⁷⁰⁾ O VEGF trap liga-se a todas as isoformas VEGF-A, com um afinidade superior à do Bevacizumab, funcionando como mecanismo de “armadilha”. Oliveira et al⁽⁷¹⁾ recentemente demonstrou que o VEGF-*trap* bloqueia a NVK induzida por bFGF em modelos murinos, Outra vantagem deste receptor é a sua prolongada duração de ação,⁽⁷²⁾ podendo vir a tornar-se mais eficaz do que o bevacizumab na terapêutica da NVK. A FDA aprovou recentemente a utilização de VEGF *trap-eye* (Aflibercept; Regeneron) em injeção intravítrea para o tratamento neovascularização corioideia na DMI,⁽⁷³⁾ o que poderá vir a reduzir os efeitos secundários do VEGF *trap* (administrado por via sistémica)
- **siRNA (silence RNA)**, fragmentos de RNA de cadeia dupla utilizados para silenciar genes dos quais são homólogos, através do envio de cópias duplicadas para a célula.⁽⁷⁴⁾ Esta molécula atravessa as barreiras celulares e inibe o processamento pós-transcrição, podendo ter como alvo os efeitos intra e extracelulares do VEGF e seus receptores e, potencialmente, reduzir a NVK

numa extensão superior à dos anticorpos e mecanismos “armadilha” anti-VEGF. Apesar da dificuldade em determinar a sequência celular “alvo” mais adequada para a intervenção do siRNA, este demonstrou inibir a expressão de VEGF induzido pela hipóxia em células corneanas humanas *in vitro*, e causar a regressão de NVK induzida por lesões alcalinas em modelos murinos.⁽²³⁾

- **Inibição de receptores tirosina-cínase**, que desempenham uma função fundamental na transdução de sinal nas vias VEGF, FGF e PDGF, regulando processos como proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais.⁽¹⁰⁾ No presente estão em estudo vários inibidores multicínase do VEGFR-1 e VEGFR-2, assim como do PEDGFR. Inibidores que atuem simultaneamente nos VEGFR e PEDGFR poderão contribuir para a regressão da proliferação de células endoteliais em vários modelos de NVK.⁽²³⁾

Apesar da sua eficácia na inibição e regressão da angiogénese, a diminuição do VEGF na córnea pode, a longo prazo, vir a causar reações adversas como atraso na cicatrização de lesões, perda de integridade epitelial e diminuição da espessura da córnea.⁽⁷⁵⁾ Estes efeitos podem ser em parte devidos à ação neurotófica do VEGF.⁽⁷⁶⁾

Estudos para melhor esclarecer a eficácia, dosagem e segurança destas terapêuticas nos diferentes contextos da NVK serão necessários.

B. Vasos Corneanos Maduros

A eficácia das terapêuticas farmacológicas anti-angiogénicas é questionável quando aplicada em neovasos maduros, cobertos por pericitos e pouco dependentes do controlo por factores angiogénicos.^(77, 78) Nestes casos pode ser necessário recorrer a métodos angio-oclusivos, potencialmente combinados com terapêutica anti-angiogénica. São exemplos destes métodos: Árgon LASER, Terapêutica Fotodinâmica (Photodynamic Therapy – PTD), e Diatermia com agulha fina.⁽³⁾

O Árgon LASER induz a fotocoagulação vascular e é geralmente aplicado no contexto da prevenção pré-queratoplastia da rejeição de enxertos, em combinação com o bevacizumab.⁽³⁾ Apesar de ser um método aparentemente seguro, a destruição de vasos por coagulação pode ativar mediadores inflamatórios e suprarregular o VEGF. Adicionalmente, os elevados níveis de energia necessários para o funcionamento do LASER podem causar hemorragias córneas periféricas, atrofia da íris, ectasia da pupila ou diminuição da espessura corneana.⁽⁶²⁾

A PTD recorre ao laser para gerar radicais livres de O₂, que causam destruição dos vasos através da sua citotoxicidade para células vasculares endoteliais.^(62, 79) Na Diatermia com agulha fina, uma agulha de aço inoxidável é inserida perto do lúmen ou adjacente à neovasculatura, enquanto uma corrente térmica ou eléctrica é utilizada para cauterizar os vasos.⁽⁵⁷⁾ Apesar destas técnicas serem largamente utilizadas com sucesso e segurança na NVK, à semelhança do que acontece com o Árgon LASER, podem ativar a resposta inflamatória e, conseqüentemente, exacerbar a causa da NVK.⁽⁸⁰⁾

C. Terapêuticas anti-linfangiogénicas na queratoplastia

Foi há mais de cem anos, em 1905, que se realizou o primeiro transplante de córnea bem sucedido no homem, sem recurso a tipagem HLA ou a terapêuticas imunossupressoras.⁽⁶²⁾ Na atualidade, cerca de 90% dos transplantes de córnea retêm a transparência ao fim de um ano, e 55% após 15 anos.⁽⁸¹⁾ Os excelentes resultados no outcome de sobrevida dos enxertos devem-se aos privilégios imune e avascular corneanos. Quando o tecido dador é colocado num leito vascular vascularizado considera-se que o transplante é de alto risco e a probabilidade de rejeição do enxerto pelo do sistema imunitário acresce.⁽⁸²⁾ A NVK que pode suceder à queratoplastia (NVK iatrogénica) é também um dos factores de risco para a falência deste procedimento.^(61, 83)

Com a deteção de marcadores específicos para o endotélio linfático, como o VEGFR-3,⁽⁶¹⁾ foi possível determinar que os vasos linfáticos perfazem cerca de 10% dos neovasos detectados após o transplante corneano. A linfangiogénese poderá ser uma das razões major para a ativação do sistema imunitário do hospedeiro contra um enxerto corneano.⁽⁸⁴⁾ Os vasos linfáticos funcionam como braço aferente da resposta imune, permitindo que células apresentadoras de antigénios e material antigénico cheguem ao gânglio linfático regional. Os vasos sanguíneos são o braço eferente da resposta imune, permitindo a chegada de células efectoras do sistema imunitário aos tecidos alvo. A modulação de ambos os braços do reflexo imunitário através da terapêutica anti hema- e linfangiogénica tem-se revelado útil na melhoria da sobrevivência de enxertos, quando aplicada quer antes, quer após a queratoplastia.⁽⁸⁴⁾

Impedir o acesso do sistema imunitário do hospedeiro à córnea dadora é a primeira linha de prevenção da falência do transplante. O bloqueio da NVK e da inflamação crónica causada por estados patológicos infecciosos ou inflamatórios, poderia evitar o desenvolvimento de estados de alto risco do leito receptor, constituindo uma forma de prevenção primária da rejeição de um enxerto. Estudos

em modelos murinos demonstraram que o bloqueio pré-queratoplastia da linfangiogénese durante a inflamação corneana melhora a sobrevida do enxerto que irá ser transplantado.⁽⁸⁵⁾ Quando a NVK já ocorreu antes da queratoplastia, a prevenção secundária da rejeição implica a regressão dos vasos neoformados. A regressão poderá ser atingida através de terapêuticas angio-oclusivas adjuvadas com mecanismos “armadilha” para factores pro-angiogénicos, das quais é exemplo a terapêutica que combina cauterização de vasos com bevacizumab, já em ensaios clínicos.⁽⁸⁰⁾ Apesar destas terapêuticas de prevenção secundária representarem uma esperança na diminuição da neovascularização dos leitos receptores, não está, todavia, totalmente esclarecido o mecanismo que levará à regressão dos vasos linfáticos patológicos.⁽⁶¹⁾

Após a queratoplastia, a terapêutica da neovascularização leva a que haja uma diminuição do contacto direto entre o enxerto e os vasos que o rodeiam, prevenindo assim a sensibilização imediata pelo sistema imunitário e a rejeição do enxerto. Cursiefen et al⁽⁸⁶⁾ demonstrou que, recorrendo ao VEGF-*trap*, a inibição pós-operatória da linfangiogénese e hemangiogénese em queratoplastias de baixo risco aumenta consideravelmente a sobrevida do enxerto. A inibição das vias tirosina-cínase em ratos (que têm como alvo os receptores VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) levou também a um acréscimo da taxa de sobrevivência dos enxertos.⁽⁸⁷⁾

Apesar do desenvolvimento de fármacos progressivamente mais específicos na prevenção da rejeição do transplante, os corticoesteróides tópicos representam ainda como a principal terapêutica pós-queratoplastia.⁽⁵⁸⁾

D. Novas terapêuticas e perspectivas futuras

A concepção de drogas anti-angiogénicas, como os inibidores VEGF, aprovadas no tratamento do cancro e na neovascularização secundária à DMI, deveu-se parcialmente à contribuição de dados de ensaios na angiogénese corneana.⁽⁸⁸⁾ Curiosamente, o desenvolvimento de agentes antiangiogénicos específicos para a córnea ainda está em curso, sendo apenas *off-label* o uso dos agentes disponíveis.

Um dos componentes anti-angiogénicos que já atingiu o estado de ensaio clínico controlado é o IRS-1. Este é um oligonucleotídeo *antisense*, desenhado para inibir a expressão de *insulin receptor substrate-1*, uma proteína citosólica envolvida na organização de hormonas de crescimento e sinalização de receptores de citocinas.⁽⁸⁸⁾ Outras moléculas como o bFGF, as MMPs, angiostatina, endostatina ou PDGF são também potenciais alvos na terapêutica da NVK.^(82, 89)

As barreiras fisiológicas do olho, como as lágrimas, que limitam a biodisponibilidade dos fármacos administrados, e as consequências a longo prazo das injeções intraoculares repetidas, são exemplos das já bem estudadas desvantagens das terapêuticas disponíveis para a NVK. Estas falhas poderão, futuramente, vir a ser ultrapassadas através do recurso à nanotecnologia. Para além do método de silenciamento de genes através de siRNA, técnicas como a injeção de vetores recombinantes, capazes de mediar a transdução de tecido corneano ao codificar moléculas como a endostatina ou o VEGFR-1, têm sido sujeitas a ensaios clínicos.^(90, 91)

Discussão

A córnea, cuja transparência otimiza o poder refratário e a acuidade visual do olho, é dotada de um privilégio (anti)angiogénico. Este é mantido graças ao delicado equilíbrio entre mecanismos e factores pro- e anti-angiogénicos. Quando, devido a perturbações químicas, mecânicas, degenerativas ou infecciosas, o equilíbrio é alterado em favor da angiogénese, desenvolvem-se neovasos que podem comprometer severamente a performance corneana. Os neovasos corneanos, particularmente os linfáticos, vão ser também responsáveis pelo aumento do risco de rejeição de um enxerto corneano transplantado.

As terapêuticas disponíveis para a NVK podem, de uma forma geral, ser classificadas como angioregressivas, angiostáticas e angio-oclusivas, sendo a escolha da terapêutica mais adequada à patologia determinada pelo estado de maturação dos neovasos. A terapêutica da neovascularização é também benéfica na diminuição da taxa de rejeição de enxertos na queratoplastia, e otimizada quando aplicada quer antes do transplante, de forma preventiva, quer após o mesmo, como forma de evitar o contacto entre o enxerto e a vasculatura linfática do hospedeiro.

Os métodos terapêuticos utilizados atualmente na prática clínica, dos quais de destacam os agentes anti-inflamatórios e anticorpos anti-VEGF, para além de não terem sido desenvolvidas especificamente para a córnea, são, a longo prazo, dotados de efeitos secundários indesejados. A compreensão progressiva dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na angiogénese, assim como o desenvolvimento de métodos mais eficazes de administração terapêutica permitirão que no futuro se otimize o processo de restauração daquele que se considera ser o maior privilégio da córnea, a avascularidade.

Referências Bibliográficas

1. Beebe DC. Maintaining transparency: a review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues. *Seminars in cell & developmental biology*. 2008;19(2):125-33.
2. Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K, Kimura K, Shiomi T, Kimura N, et al. Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nature medicine*. 2006;12(10):1151-9.
3. Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, Tobaigy F, Han KY, Jain S, et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Progress in retinal and eye research*. 2010;29(3):208-48.
4. Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. Mediators of ocular angiogenesis. *Journal of genetics*. 2009;88(4):495-515.
5. Zhang SX, Ma JX. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Progress in retinal and eye research*. 2007;26(1):1-37.
6. Bock F, Maruyama K, Regenfuss B, Hos D, Steven P, Heindl LM, et al. Novel anti(lymph)angiogenic treatment strategies for corneal and ocular surface diseases. *Progress in retinal and eye research*. 2013;34:89-124.
7. Menzel-Severing J. Emerging techniques to treat corneal neovascularisation. *Eye (London, England)*. 2012;26(1):2-12.
8. Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Survey of ophthalmology*. 2007;52 Suppl 1:S3-19.
9. Bachmann B, Taylor RS, Cursiefen C. The association between corneal neovascularization and visual acuity: a systematic review. *Acta ophthalmologica*. 2013;91(1):12-9.
10. Maddula S, Davis DK, Maddula S, Burrow MK, Ambati BK. Horizons in therapy for corneal angiogenesis. *Ophthalmology*. 2011;118(3):591-9.
11. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea*. 1998;17(6):611-3.
12. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Survey of ophthalmology*. 1998;43(3):245-69.
13. Rajappa M, Saxena P, Kaur J. Ocular angiogenesis: mechanisms and recent advances in therapy. *Advances in clinical chemistry*. 2010;50:103-21.
14. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 1998;125(4):725-32.
15. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.
16. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer treatment and research*. 2004;117:3-32.
17. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(16):10931-4.
18. D'Amore PA. Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1994;35(12):3974-9.
19. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*. 1995;1(1):27-31.

20. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353-64.
21. Azar DT. 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*. 2006;104:264-302.
22. Ma DH, Chen JK, Zhang F, Lin KY, Yao JY, Yu JS. Regulation of corneal angiogenesis in limbal stem cell deficiency. *Progress in retinal and eye research*. 2006;25(6):563-90.
23. Singh N, Higgins E, Amin S, Jani P, Richter E, Patel A, et al. Unique homologous siRNA blocks hypoxia-induced VEGF upregulation in human corneal cells and inhibits and regresses murine corneal neovascularization. *Cornea*. 2007;26(1):65-72.
24. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata T, Kitamura H, Ohashi R, et al. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *The American journal of pathology*. 2001;159(2):599-608.
25. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):26-45.
26. Visconti RP, Richardson CD, Sato TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(12):8219-24.
27. Page-McCaw A. Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Seminars in cell & developmental biology*. 2008;19(1):14-23.
28. Tucker RP, Hagios C, Chiquet-Ehrismann R, Lawler J. In situ localization of thrombospondin-1 and thrombospondin-3 transcripts in the avian embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1997;208(3):326-37.
29. Cursiefen C, Masli S, Ng TF, Dana MR, Bornstein P, Lawler J, et al. Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004;45(4):1117-24.
30. Karakousis PC, John SK, Behling KC, Surace EM, Smith JE, Hendrickson A, et al. Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Molecular vision*. 2001;7:154-63.
31. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*. 1999;285(5425):245-8.
32. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Current opinion in cell biology*. 2000;12(5):634-40.
33. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2002;6(1):1-12.
34. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*. 2003;22(42):6549-56.
35. Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(31):27872-9.

36. Fukumoto S, Morifuji M, Katakura Y, Ohishi M, Nakamura S. Endostatin inhibits lymph node metastasis by a down-regulation of the vascular endothelial growth factor C expression in tumor cells. *Clinical & experimental metastasis*. 2005;22(1):31-8.
37. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, Lu H, Knebelmann B, Segal M, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(17):11721-6.
38. Ambati BK, Jousseaume AM, Ambati J, Moromizato Y, Guha C, Javaherian K, et al. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Archives of ophthalmology*. 2002;120(8):1063-8.
39. Abdiu O, Van Setten G. Antiangiogenic activity in tears: presence of pigment-epithelium-derived factor. New insights and preliminary results. *Ophthalmic research*. 2008;40(1):16-8.
40. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*. 2006;443(7114):993-7.
41. Ambati BK, Patterson E, Jani P, Jenkins C, Higgins E, Singh N, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. *The British journal of ophthalmology*. 2007;91(4):505-8.
42. Ma DH, Chen HC, Lai JY, Sun CC, Wang SF, Lin KK, et al. Matrix revolution: molecular mechanism for inflammatory corneal neovascularization and restoration of corneal avascularity by epithelial stem cell transplantation. *The ocular surface*. 2009;7(3):128-44.
43. Cursiefen C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chemical immunology and allergy*. 2007;92:50-7.
44. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*. 1971;229(5286):560-1.
45. Gipson IK. The epithelial basement membrane zone of the limbus. *Eye (London, England)*. 1989;3 (Pt 2):132-40.
46. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *The Journal of cell biology*. 1986;103(1):49-62.
47. Espana EM, Ti SE, Grueterich M, Touhami A, Tseng SC. Corneal stromal changes following reconstruction by ex vivo expanded limbal epithelial cells in rabbits with total limbal stem cell deficiency. *The British journal of ophthalmology*. 2003;87(12):1509-14.
48. Tsai RJ, Tseng SC. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea*. 1994;13(5):389-400.
49. Stevenson W, Cheng SF, Dastjerdi MH, Ferrari G, Dana R. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: ranibizumab (Lucentis) vs bevacizumab (Avastin). *The ocular surface*. 2012;10(2):67-83.
50. Cursiefen C, Maruyama K, Jackson DG, Streilein JW, Kruse FE. Time course of angiogenesis and lymphangiogenesis after brief corneal inflammation. *Cornea*. 2006;25(4):443-7.
51. Liesegang TJ. Physiologic changes of the cornea with contact lens wear. *The CLAO journal : official publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists, Inc*. 2002;28(1):12-27.
52. Samolov B, Steen B, Seregard S, van der Ploeg I, Montan P, Kvanta A. Delayed inflammation-associated corneal neovascularization in MMP-2-deficient mice. *Experimental eye research*. 2005;80(2):159-66.

53. Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain research bulletin*. 2010;81(2-3):198-210.
54. Usui T, Yamagami S, Kishimoto S, Seiich Y, Nakayama T, Amano S. Role of macrophage migration inhibitory factor in corneal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(8):3545-50.
55. Chen P, Yin H, Wang Y, Wang Y, Xie L. Inhibition of VEGF expression and corneal neovascularization by shRNA targeting HIF-1alpha in a mouse model of closed eye contact lens wear. *Molecular vision*. 2012;18:864-73.
56. Cursiefen C, Chen L, Dana MR, Streilein JW. Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms, and implications for corneal transplant immunology. *Cornea*. 2003;22(3):273-81.
57. Gonzalez L, Loza RJ, Han KY, Sunoqrot S, Cunningham C, Purta P, et al. Nanotechnology in corneal neovascularization therapy--a review. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2013;29(2):124-34.
58. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Current opinion in ophthalmology*. 2001;12(4):242-9.
59. Cursiefen C, Seitz B, Dana MR, Streilein JW. [Angiogenesis and lymphangiogenesis in the cornea. Pathogenesis, clinical implications and treatment options]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 2003;100(4):292-9.
60. Cursiefen C, Hofmann-Rummelt C, Kuchle M, Schlotzer-Schrehardt U. Pericyte recruitment in human corneal angiogenesis: an ultrastructural study with clinicopathological correlation. *The British journal of ophthalmology*. 2003;87(1):101-6.
61. Cursiefen C, Colin J, Dana R, Diaz-Llopis M, Faraj LA, Garcia-Delpech S, et al. Consensus statement on indications for anti-angiogenic therapy in the management of corneal diseases associated with neovascularisation: outcome of an expert roundtable. *The British journal of ophthalmology*. 2012;96(1):3-9.
62. Gupta D, Illingworth C. Treatments for corneal neovascularization: a review. *Cornea*. 2011;30(8):927-38.
63. Aydin E, Kivilcim M, Peyman GA, Esfahani MR, Kazi AA, Sanders DR. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by various doses of doxycycline and combination of triamcinolone acetonide with low-molecular-weight heparin and doxycycline. *Cornea*. 2008;27(4):446-53.
64. Cheng HC, Yeh SI, Tsao YP, Kuo PC. Subconjunctival injection of recombinant AAV-angiostatin ameliorates alkali burn induced corneal angiogenesis. *Molecular vision*. 2007;13:2344-52.
65. Abbas A, Khan B, Feroze AH, Hyman GF. Thalidomide prevents donor corneal graft neovascularization in an alkali burn model of corneal angiogenesis. *JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2002;52(10):476-82.
66. Chang JH, Garg NK, Lunde E, Han KY, Jain S, Azar DT. Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Survey of ophthalmology*. 2012;57(5):415-29.
67. Avisar I, Weinberger D, Kremer I. Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injections on corneal neovascularization in a mouse model. *Current eye research*. 2010;35(2):108-15.

68. Pieramici DJ, Rabena MD. Anti-VEGF therapy: comparison of current and future agents. *Eye (London, England)*. 2008;22(10):1330-6.
69. Kuchle M, Cursiefen C, Nguyen NX, Langenbucher A, Seitz B, Wenkel H, et al. Risk factors for corneal allograft rejection: intermediate results of a prospective normal-risk keratoplasty study. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2002;240(7):580-4.
70. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(17):11393-8.
71. Oliveira HB, Sakimoto T, Javier JA, Azar DT, Wiegand SJ, Jain S, et al. VEGF Trap(R1R2) suppresses experimental corneal angiogenesis. *European journal of ophthalmology*. 2010;20(1):48-54.
72. Stewart MW, Rosenfeld PJ. Predicted biological activity of intravitreal VEGF Trap. *The British journal of ophthalmology*. 2008;92(5):667-8.
73. Stewart MW. Aflibercept (VEGF Trap-eye): the newest anti-VEGF drug. *The British journal of ophthalmology*. 2012;96(9):1157-8.
74. Dratviman-Storobinsky O, Lubin BC, Hasanreisoglu M, Goldenberg-Cohen N. Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injection on angiogenic gene expression levels in a mouse model of corneal neovascularization. *Molecular vision*. 2009;15:2326-38.
75. Bock F, Onderka J, Rummelt C, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, et al. Safety profile of topical VEGF neutralization at the cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(5):2095-102.
76. Yu CQ, Zhang M, Matis KI, Kim C, Rosenblatt MI. Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(9):3870-8.
77. Lin CT, Hu FR, Kuo KT, Chen YM, Chu HS, Lin YH, et al. The different effects of early and late bevacizumab (Avastin) injection on inhibiting corneal neovascularization and conjunctivalization in rabbit limbal insufficiency. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(12):6277-85.
78. Oshima Y, Oshima S, Nambu H, Kachi S, Takahashi K, Umeda N, et al. Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(8):963-5.
79. Gupta D, Illingworth C. Treatments for Corneal Neovascularization: A Review. *Cornea*. 2011.
80. Koenig Y, Bock F, Kruse FE, Stock K, Cursiefen C. Angioregressive pretreatment of mature corneal blood vessels before keratoplasty: fine-needle vessel coagulation combined with anti-VEGFs. *Cornea*. 2012;31(8):887-92.
81. Williams KA, Coster DJ. The immunobiology of corneal transplantation. *Transplantation*. 2007;84(7):806-13.
82. Bachmann B, Taylor RS, Cursiefen C. Corneal neovascularization as a risk factor for graft failure and rejection after keratoplasty: an evidence-based meta-analysis. *Ophthalmology*. 2010;117(7):1300-5 e7.
83. Bachmann BO, Bock F, Wiegand SJ, Maruyama K, Dana MR, Kruse FE, et al. Promotion of graft survival by vascular endothelial growth factor a neutralization after high-risk corneal transplantation. *Archives of ophthalmology*. 2008;126(1):71-7.

84. F CCEK. New Aspects of Angiogenesis in the Cornea. Cornea and External Eye Disease. Essentials in Ophthalmology:: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany; 2006. p. 83-99.
85. Lam VM, Nguyen NX, Martus P, Seitz B, Kruse FE, Cursiefen C. Surgery-related factors influencing corneal neovascularization after low-risk keratoplasty. American journal of ophthalmology. 2006;141(2):260-6.
86. Cursiefen C, Cao J, Chen L, Liu Y, Maruyama K, Jackson D, et al. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. Investigative ophthalmology & visual science. 2004;45(8):2666-73.
87. Hos D, Bock F, Dietrich T, Onderka J, Kruse FE, Thierauch KH, et al. Inflammatory corneal (lymph)angiogenesis is blocked by VEGFR-tyrosine kinase inhibitor ZK 261991, resulting in improved graft survival after corneal transplantation. Investigative ophthalmology & visual science. 2008;49(5):1836-42.
88. Regenfuss B, Bock F, Parthasarathy A, Cursiefen C. Corneal (lymph)angiogenesis--from bedside to bench and back: a tribute to Judah Folkman. Lymphatic research and biology. 2008;6(3-4):191-201.
89. Zaki AA, Farid SF. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. Acta ophthalmologica. 2010;88(8):868-71.
90. Murthy RC, McFarland TJ, Yoken J, Chen S, Barone C, Burke D, et al. Corneal transduction to inhibit angiogenesis and graft failure. Investigative ophthalmology & visual science. 2003;44(5):1837-42.
91. Lai CM, Brankov M, Zaknich T, Lai YK, Shen WY, Constable IJ, et al. Inhibition of angiogenesis by adenovirus-mediated sFlt-1 expression in a rat model of corneal neovascularization. Human gene therapy. 2001;12(10):1299-310.

Agradecimentos

Ao Dr Luís Figueira por ter aceitado orientar o meu Projeto de Opção, e por toda a amabilidade, disponibilidade e compreensão demonstradas durante a elaboração do mesmo.

Aos meus pais e irmão pelo apoio incondicional, e por nunca terem permitido que me derrotasse pelo desânimo.

Deixo também a minha gratidão a todos os amigos e família que me acompanharam durante o percurso académico.

Anexos

Normas para Publicação

ISSN 0871-8644

Os manuscritos devem ser dactilografados a dois espaços e de cada artigo devem ser enviados ao editor o original e uma cópia.

Título: A primeira página é reservada para o título e para os nomes dos autores.

Resumo: A segunda página é reservada para o resumo em português e em inglês. O sumário deve sintetizar o conteúdo do artigo e não conter mais do que 400 palavras. O resumo deve referir-se aos motivos que levaram à realização do trabalho, aos resultados e às conclusões.

Palavras-chave: A terceira página é reservada para as palavras-chave que também devem ser apresentadas em português e em inglês e não devem ser mais do que cinco.

Legendas das figuras: A quarta página destina-se às legendas das figuras. O texto das legendas deve ser sintético e cada figura será numerada.

Artigos: Os artigos originais devem ser organizados da seguinte maneira: após uma breve introdução sobre o assunto a ser apresentado, seguir-se-à o capítulo do material e métodos ou a descrição dos casos clínicos, de modo tão preciso que outrem possa repetir ou comparar os mesmos factos. Os resultados serão depois apresentados e, por último, seguir-se-à o capítulo da discussão para elucidar os resultados através da sua própria análise e do confronto com os resultados de outros autores.

Bibliografia: As referências bibliográficas devem ser incluídas em páginas separadas do corpo do artigo e numeradas. As citações bibliográficas serão feitas no texto apenas com os números entrelinhados das respectivas referências. Sempre que possível, as referências devem ser feitas apenas a trabalhos originais e seguirão o seguinte esquema para Revistas (1), Livros (2) e Capítulo de livros (3):

(1) Barondes M, Pauleikhoff D, Chisholm IC, Misassian D, Bird AC: Bilaterality of drusen. Br. J. Ophthalmol 74: 180-2, 1990.

(2) Helveston EM: Atlas of Strabismus surgery. 3ª ed., St. Louis; CV Mosby, 1985, p. 156.

(3) Linfoot JA: Neuro-ophthalmological considerations in pituitary tumors. In: Linfoot JA, ed. Recent advances in the diagnosis and treatment of pituitary tumors. New York: Raven Press, 1979: 131-9.

Fotografias, gráficos e diagramas: Cada ilustração deve ser numerada e citada por ordem no texto. No verso da ilustração deve inscrever-se o número, uma seta para indicar a orientação e o nome do primeiro autor. As ilustrações a cores serão pagas pelos autores.

Quadros: Cada quadro deve ter um título, ser numerado e indicado por ordem no texto. A primeira linha é para a numeração e a segunda para o título. Mais explicações relativas ao quadro devem ser inscritas resumidamente na sua base, utilizando sinais convencionais.

Separatas: As separatas devem ser requisitadas desde o início pelo autor, estabelecendo-se o preço de ocasião.