

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA OFTÁLMICA

JULIANA PIMENTEL ROCHA

**Potencialização dos efeitos de anti-VEGF por  
heparinas. Papel da inibição da angiogênese em  
doenças oculares.**

SÃO PAULO

2022

JULIANA PIMENTEL ROCHA

**Potencialização dos efeitos de anti-VEGF por  
heparinas. Papel da inibição da angiogênese em  
doenças oculares.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora da Unidade Curricular de Trabalho de Produção Intelectual do Curso de Tecnologia Oftálmica para obtenção do diploma de Tecnóloga Oftálmica pela Universidade Federal de São Paulo.

Orientadora: Juliana Luporini Dreyfuss Regatieri

Supervisora: Bruna Zancanelli Fetter

SÃO PAULO

2022

Rocha, Juliana Pimentel

**Potencialização dos efeitos de anti-VEGF por heparinas. Papel da inibição da angiogênese em doenças oculares.**/ Juliana Pimentel Rocha.  
– São Paulo, 2022.

32f.

Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal de São Paulo.  
Escola Paulista de Medicina. Tecnologia Oftálmica.

1. Angiogênese 2. Anti-VEGF 3. Degeneração macular relacionada à idade 4. Heparinas

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Prof. Dra. Juliana Dreyfuss, por todo apoio e ensinamentos durante os anos em que fui aluna de Iniciação Científica.

À minha supervisora, Ms. Bruna Fetter, que esteve presente em todos os momentos, me ajudando e incentivando, e por ser uma grande companheira de laboratório e amiga.

À minha amiga e colega de laboratório, Dra. Thatiane Russo, que foi uma grande parceira desde o início da minha iniciação científica, me ensinando sempre com muita paciência e carinho.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes durante a graduação, tornando meus dias mais leves e felizes, em especial, Gabriela, Bruna, Natalia e Kendy, que se tornaram amigos para a vida.

À minha prima Carolina, que além de ser minha família, também é colega de profissão, e me ajudou em vários momentos de dúvida durante os meus estudos. Obrigada por todo o incentivo e companhia sempre.

À minha família, em especial meus pais, Liliane e Silvio Sérgio, meu irmão Leonardo e meu companheiro Johnny, que sempre me incentivaram e formaram uma grande rede de apoio para que tudo fosse possível.

## Resumo

**Objetivo:** O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a potencialização da ação antiangiogênica do anti-VEGF bevacizumabe pela heparina-6-dessulfatada *in vitro* em culturas de células endoteliais e testar a possível citotoxicidade destes compostos em células de retina humana ARPE-19. **Métodos:** A metodologia do trabalho consiste em cultura de células endoteliais de aorta de coelho (CLPs) e células da retina humana (ARPE-19), e experimentos *in vitro* para analisar o efeito do anti-VEGF bevacizumabe potencializado por heparina-6-dessulfatada quando tratadas as células com diversas concentrações desses compostos para que fosse possível analisar a migração celular, proliferação, e citotoxicidade na CLPs e na ARPE-19 e a formação de estruturas do tipo capilar na CLPs. Para analisar os resultados dos experimentos, foi utilizado o software ImageJ para cálculo da área de migração celular e para cálculo da quantidade de estruturas do tipo capilar formadas nas células. Já para contagem das células no experimento de proliferação, foi utilizado o microscópio InCell e seu próprio software de análise de dados. Para análise de citotoxicidade celular, foi utilizado um espectrofotômetro ajustado em 540nm. Os gráficos dos resultados foram gerados pelo GraphPad Prism 8.0. **Resultados:** As três concentrações da Heparina 6-O dessulfatada potencializando Bevacizumabe se mostraram eficazes em diminuir a proliferação celular em ARPE-19 e CLPs, diminuir a migração celular em ARPE-19 e CLPs, e diminuir a formação de estruturas do tipo capilar sobre Matrigel em CLPs. Não houve alteração da viabilidade celular pelas drogas.

## Lista de figuras

**Figura 1.** Esquema da formação de drusas e neovascularização da coróide (adaptado de OcuCure Therapeutics).

**Figura 2.** Representação esquemática da angiogênese. (1) estimulação das células endoteliais por citocinas angiogênicas; (2) degradação da membrana basal do vaso, migração e proliferação das células endoteliais e formação do broto; (3) expansão do broto e formação do lúmen do vascular e nova membrana basal; (4) novo vaso formado, amadurecido e funcional [11].

**Figura 3.** Gráfico do ensaio de viabilidade celular (MTT) de células endoteliais (CLPs) tratadas com diferentes concentrações de heparina-6-dessulfatada (Hep6D) ou Hep6D+bevacizumabe ou bevacizumabe (bev). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

**Figura 4.** Gráfico do ensaio de viabilidade celular (MTT) de células de retina (ARPE-19) tratadas com diferentes concentrações de heparina-6-dessulfatada (Hep6D) ou Hep6D+bevacizumabe ou bevacizumabe (bev). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

**Figura 5.** Gráfico de ensaio de proliferação celular de células endoteliais de aorta de coelho tratadas com diferentes concentrações de heparina-6-dessulfatada (Hep6D) ou Hep6D+bevacizumabe ou bevacizumabe (bev). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

**Figura 6.** Gráfico do experimento de proliferação celular das células ARPE-19 após tratadas com diferentes concentrações de heparina-6-dessulfatada (Hep6D) ou Hep6D+bevacizumabe ou bevacizumabe (bev). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

**Figura 7.** Gráficos do experimento de migração celular em CLPs com cada tipo de droga.

**Figura 8.** Gráficos do experimento de migração celular em ARPE-19 com cada tipo de droga.

**Figura 9.** Imagens do ensaio de formação de estruturas do tipo capilar em Matrigel.

**Figura 10.** Gráfico do experimento de formação de estruturas do tipo capilar em CLPs tratadas com diferentes concentrações de heparina-6-dessulfatada (Hep6D) ou Hep6D+bevacizumabe ou bevacizumabe (bev). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1.** Tabela de resultados finais.

## **Lista de abreviações e siglas**

**ARPE-19:** célula do epitélio pigmentar da retina

**Bev:** Bevacizumabe

**CLPs:** célula endotelial de aorta de coelho

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-phenylindole

**DMEM:** meio de cultura dulbecco mem

**DMRI:** Degeneração Macular Relacionada à Idade

**DMSO:** sulfóxido de dimetilo

**EBSS:** Earle's Balanced Salt Solution

**EPR:** Epitélio Pigmentar da Retina

**F12:** meio de cultura ham-f12

**Hep/HepM:** Heparina

**Hep-6D:** Heparina 6-dessulfatada

**MEC:** Matriz extracelular

**MTT:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

**PBS:** Phosphate-buffered saline

**SFB:** soro fetal bovino

**VEGF:** Fator de crescimento endotelial vascular



## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Degeneração macular relacionada à idade	1
1.2	Degeneração macular relacionada à idade e a neovascularização	2
1.3	Anti-angiogênicos no tratamento da DMRI	4
1.4	Anti-VEGF e Heparina	5
1.5	Justificativa	6
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
2.1	Objetivo gerais	6
2.2	Objetivos específicos	7
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>7</b>
3.1	Heparinas modificadas quimicamente	7
3.2	Bevacizumabe	7
3.3	Cultura de células endoteliais de aorta de coelho	7
3.4	Cultura de células do Epitélio Pigmentar da Retina	7
3.5	Ensaio de proliferação celular	8
3.6	Ensaio de viabilidade celular por MTT	9
3.7	Formação de estruturas do tipo capilar em Matrigel	9
3.8	Ensaio de migração Wound Healing Assay	10
3.9	Forma de análise dos resultados	11
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>11</b>
4.1	Ensaio de viabilidade celular por MTT em CLPs	11
4.2	Ensaio de viabilidade celular por MTT em ARPE-19	12
4.3	Ensaio de proliferação celular em CLPs	13
4.4	Ensaio de proliferação celular em ARPE-19	14
4.5	Ensaio de migração celular por Wound Healing Assay em CLPs	14
4.6	Ensaio de migração celular por Wound Healing Assay em ARPE-19	14
4.7	Ensaio de formação de estruturas do tipo capilar em Matrigel	16
<b>5</b>	<b>COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>18</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>18</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>19</b>

## 1. INTRODUÇÃO

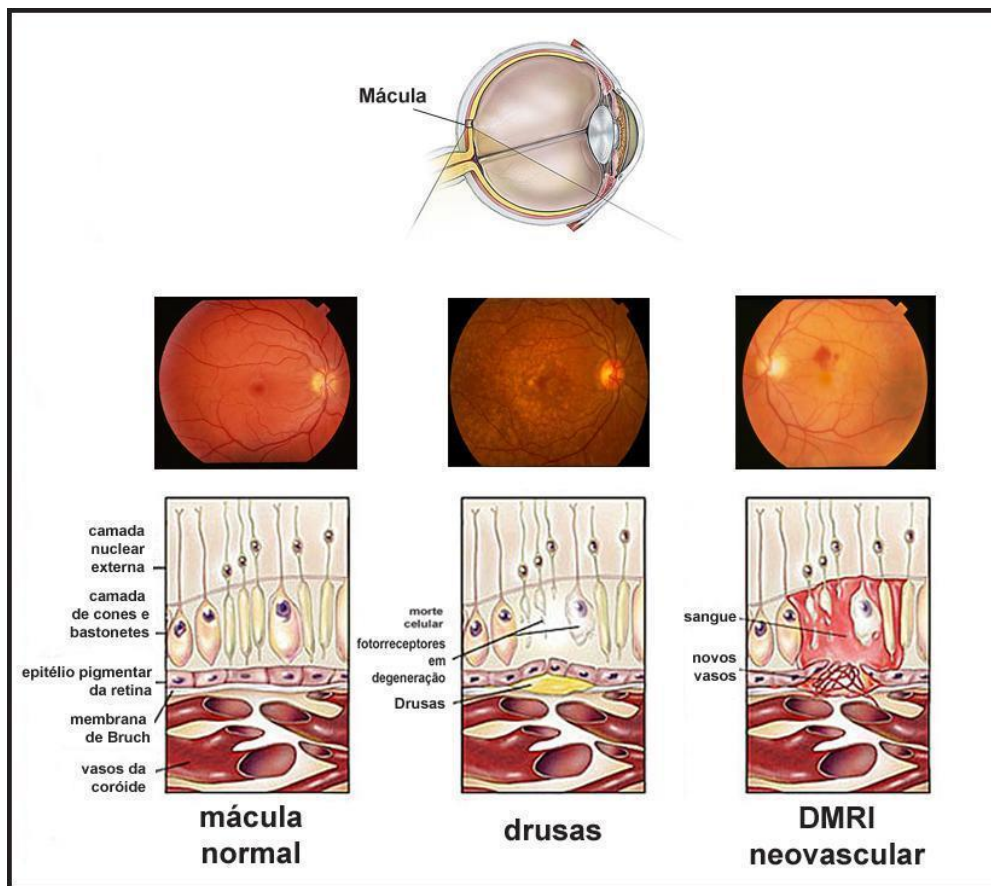
### 1.1 Degeneração macular relacionada à idade

O estudo de novas moléculas com atividade anti-angiogênica é fundamental para tratar a neovascularização da coróide que ocorre secundária à Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) em sua forma úmida[1]. Essa doença é a principal causa de baixa acuidade visual em indivíduos com mais de 50 anos em países desenvolvidos[2] impactando muito na qualidade de vida dos indivíduos afetados. Outros fatores além da idade têm sido apontados, como fatores genéticos, obesidade, tabagismo, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e alguns fatores ambientais, tal como exposição crônica à luz azul, carências na alimentação e distúrbios no metabolismo de ácidos graxos[3,5].

A DMRI afeta de 10% a 13% dos adultos com mais de 65 anos de idade na América do Norte, Europa, Austrália e, mais recentemente, Ásia. Esta patologia atrapalha profundamente a qualidade de vida desses indivíduos afetados[6]. A perda da visão é central (na mácula) e é causada pela degeneração dos fotorreceptores, células responsáveis por converter a luz em impulsos elétricos que serão transferidos ao nervo óptico, que leva essas informações ao cérebro.

Existem dois tipos de DMRI, a seca/atrófica e a neovascular/úmida. A DMRI seca é caracterizada pela presença de drusas, resultado da deposição focal de debris celulares, entre o epitélio pigmentado da retina (EPR) e a membrana de Bruch. Esses depósitos focais, são observados durante exame fundoscópico como lesões amareladas e podem ser encontrados na mácula e na periferia da retina.

A forma não neovascular é caracterizada por drusas e atrofia geográfica que se estende até o centro da mácula, causando degeneração progressiva das células fotorreceptoras e, eventualmente, da mácula. A forma neovascular ou úmida é caracterizada por neovascularização de coróide e suas sequelas. Clinicamente, a neovascularização de coróide é composta por tecido fibrovascular, sangue, fluídos exsudativos, em especial lipídeos, e está associada com atrofia. Conforme a doença progride, os neovasos que se desenvolvem a partir da coriocapilar atingem a Membrana de Bruch e penetram no espaço sub-retiniano em direção à superfície interna da retina, ocupando o espaço abaixo do EPR e destruindo a membrana de Bruch, o EPR e os fotorreceptores (Figura 1). Esta forma da doença pode progredir de forma rápida e causar grande perda visual.



**Figura 1.** Esquema da formação de drusas e neovascularização da coróide (adaptado de OcuCure Therapeutics).

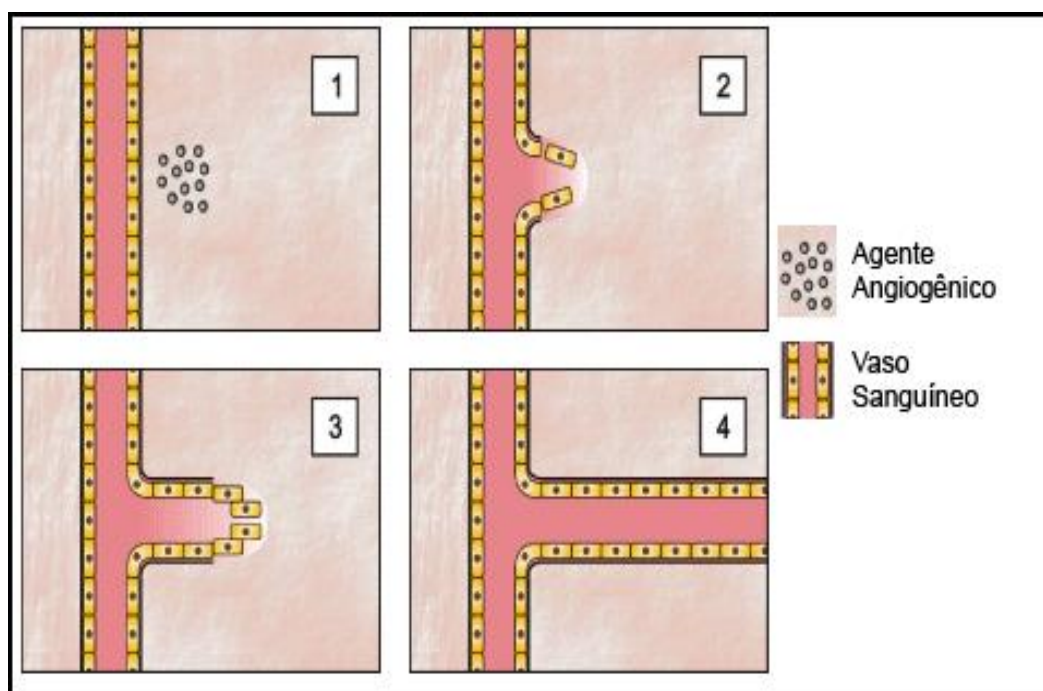
## 1.2 Degeneração macular relacionada à idade e a neovascularização

A angiogênese é a formação de vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes, e é um processo complexo que envolve células endoteliais, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular, sendo uma etapa chave em diversas doenças como câncer e doenças degenerativas.

Existem vários fatores que estimulam ou inibem o processo da angiogênese e a regulam, envolvendo processos biológicos que incluem proliferação e migração de células endoteliais, interações célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC) e organização dos vasos em estruturas do tipo capilar, assim como apoptose.

As principais etapas da angiogênese compreendem: estimulação das células endoteliais por fatores angiogênicos (p. ex. HIF-1, VEGF e FGF-2), degradação da membrana basal que circunda o vaso por enzimas secretadas pelas células endoteliais ativadas (p. ex. heparanase e metaloproteinases), proliferação e migração de células endoteliais para o sítio de formação do vaso, interação com moléculas da MEC recém sintetizada, expressão de enzimas para o remodelamento da MEC (p. ex. uroquinase e metaloproteinases), e finalmente, maturação do novo vaso, pela secreção de fatores de crescimento (p. ex. angiopoietina e PDGF) que atraem células de suporte como pericitos e células musculares lisas, e formação da membrana basal (Figura 2). Tanto as células de

suporte como a membrana basal são essenciais para o funcionamento e estabilidade do vaso formado [9, 10].



**Figura 2.** Representação esquemática da angiogênese. (1) estimulação das células endoteliais por citocinas angiogênicas; (2) degradação da membrana basal do vaso, migração e proliferação das células endoteliais e formação do broto; (3) expansão do broto e formação do lúmen do vascular e nova membrana basal; (4) novo vaso formado, amadurecido e funcional [11].

A patogênese da neovascularização de coróide não é totalmente entendida, apesar da descrição de vários mecanismos para esta doença. Para que ocorra angiogênese, é necessário haver desequilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos (VEGF, por exemplo) e fatores anti-angiogênicos (pigment epithelium derived factor, por exemplo), resultando em aumento da atividade pró-angiogênica ou diminuição da atividade anti-angiogênica[12].

Estados patológicos como hipóxia, isquemia ou inflamação, influenciam a regulação desses fatores de crescimento e deslocam o equilíbrio a favor de moléculas pró-angiogênicas. As drusas, depositadas entre a membrana de Bruch e o EPR podem conter fragmentos de complemento bioativos (C3a e C5a) [13] e produtos finais da glicação avançada (advanced glycation end products - AGE) [14], que induzem a expressão de fatores de crescimento e citocinas, e estimulam a quimiotaxia de células inflamatórias [15]. A presença de macrófagos adjacentes a áreas espessadas e roturas da membrana de Bruch em olhos com neovascularização de coróide foram também evidenciados e o exame histopatológico de lesões extraídas de cirurgias submaculares confirmaram a presença destas células [16, 17]. Estes achados, associado à evidência de aumento de biomarcadores inflamatórios em indivíduos com risco de progressão da DMRI, fortalecem a teoria de doença inflamatória relacionada à idade.

Inflamação está associada à angiogênese, e certamente a neovascularização pode ocorrer em outras doenças oculares inflamatórias[18]. Macrófagos ativados secretam enzimas que degradam a matriz extracelular, como por exemplo, metaloproteinases, cisteínoproteinases e endoglicosidases, que degradam a membrana de Bruch, possibilitando o crescimento de neovasos a partir dos capilares da coróide [18,19]. Células inflamatórias produzem citocinas, que também induzem a produção de VEGF e outros fatores pró-angiogênicos. Portanto, a super expressão de VEGF e citocinas, assim como alterações da membrana basal podem ser um ponto comum entre inflamação e formação de novos vasos em olhos com DMRI.

### **1.3 Anti-angiogênicos no tratamento da DMRI**

O tratamento da DMRI seca baseia-se na suplementação vitamínica. Novos tratamentos estão focados na prevenção da progressão da degeneração e tentativas de repovoar a mácula atrófica. A DMRI neovascular experimentou um grande avanço com o advento dos inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGF); no entanto, apesar do ranibizumabe, aflibercept e bevacizumabe serem eficazes na redução do comprometimento visual grave, os pacientes geralmente perdem visão ao longo do tempo. Portanto, a busca por novas terapias, tratamentos e diagnósticos é de fundamental importância. Os estudos estão focados em novos fármacos contra fator de crescimento endotelial anti-vascular, anticorpos contra esfingosina-1-fosfato, fator de crescimento derivado de plaquetas, terapia genética e RNA de interferência para fatores de crescimento envolvidos com angiogênese.

O ranibizumabe foi aprovado para uso em 2006. É um fragmento recombinante ao anticorpo monoclonal imunoglobulina humana (IgG1) que se liga ao VEGF-A. Sua segurança e eficácia foi comprovada em ensaios clínicos que mostraram que o tratamento com esta droga alterou morfológicamente a retina diminuindo áreas de neovascularização de coróide e reduziu a espessura central da retina, porém a acuidade visual não melhorou significativamente após o tratamento[46]. O aflibercept, o tratamento mais novo aprovado para DMRI neovascular, é uma proteína composta por segmentos de VEGFR1 e VEGFR2 fundidos com uma porção de IgG1 e funciona como um forte receptor solúvel para o VEGF, ligando-se fortemente ao VEGF impedindo que ele se ligue às células receptoras prevenindo a formação de neovasos, e os resultados do estudo deste tratamento se equiparam ao tratamento com Ranibizumabe, apenas mantendo a acuidade visual estável, sem melhora. O Bevacizumabe também é um anticorpo monoclonal IgG1 que se liga às formas ativas de VEGF-A, mas difere do Ranibizumabe por ser uma molécula completa de IgG, e é usado também para o tratamento de alguns tipos de câncer como o câncer de mama e o de pulmão. Os estudos do tratamento com esta droga mostraram melhora da acuidade visual e diminuição da espessura central da retina.

Outras opções farmacoterápicas testadas incluem inibidores de metaloproteinases, outros inibidores de VEGF, TNP-470, interferon alfa, indometacina, tranilast, inibidores de quinases e talidomida [22-27]. No entanto,

apenas terapias bloqueando o VEGF têm sido utilizadas atualmente na clínica para tratamento de neovascularização de coróide.

Os proteoglicanos e glicosaminoglicanos estão envolvidos na modulação da neovascularização em condições fisiológicas ou patológicas. Essa modulação ocorre pela interação com fatores de crescimento angiogênicos ou ainda com reguladores negativos da angiogênese. Essas interações podem ajudar no desenvolvimento de análogos com propriedades angiostáticas [28]. Heparinas de baixo peso molecular e seus fragmentos, heparinas modificadas e heparinomiméticos também possuem a capacidade de inibir a angiogênese. Estudos mostram que oligossacarídeos (octassacarídeos e hexassacarídeos) de heparina possuem a capacidade de inibir a angiogênese mediada pelo FGF-2 in vivo[34]. Lange et al, 2007, mostraram que a injeção intravítrea de um análogo de heparina, o 5-amino-2-naftalonesulfonato reduz a neovascularização de retina em camundongos induzida por oxigênio, reduzindo significativamente as mudanças angioproliferativas (tortuosidade e aglomerado de neovasos). Este composto se liga ao sítio de ligação da heparina no FGF-1 e FGF-2, inibindo-os[35]. A tinzaparina, que é uma heparina de baixo peso molecular com atividade anticoagulante, também mostrou potente atividade anti-angiogênica em ensaios de formação de capilares por células endoteliais in vitro. Outra molécula derivada de heparina, o heparinóide de camarão *L. vannamei*, foi capaz de reduzir em mais de 50% a neovascularização de coróide induzida por laser em ratos[34]. Dados do nosso laboratório indicam a atividade antiangiogênica de uma heparina 6-dessulfatada muito promissora pois os resultados dos ensaios in vitro realizados em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) mostraram inibição da proliferação e migração celular, e também inibição da formação de estruturas do tipo capilar em cultura.

#### **1.4 Anti-VEGF e Heparina**

O estudo de Tsiros, D. et al 2019 [47] mostra que alguns fatores alteram a eficácia de ligação do Bevacizumabe ao VEGF, como por exemplo a mudança do pH extracelular o que diminui a interação VEGF-Bevacizumabe. No entanto, este estudo mostra que a heparina consegue resgatar a ligação bevacizumabe-VEGF em pH baixo, protegendo e fortalecendo esta interação.

Além disso a heparina potencializa a inibição da ligação da fibronectina ao VEGF mediada pelo Bevacizumabe [47] e a heparina tem capacidade de expandir a utilidade clínica do Bevacizumabe, pois resgata a interação Bevacizumabe-VEGF em pH ácido, aumenta a capacidade do Bevacizumabe de inibir a ligação VEGF às células. Neste estudo citado, foi observado que a heparina aumenta a ligação do VEGF ao Bevacizumabe impedindo a ligação do VEGF ao VEGFR2, e indica também que estes eventos de ligação não são mutuamente exclusivos.

Outro estudo do mesmo grupo, Tsiros, D. et al 2021 [48] também indica que a Heparina potencializa o efeito inibitório de VEGF pelo Bevacizumabe [48]. Complexos de heparina-bevacizumabe mostram ligação ao VEGF aprimorada e inibição da migração de células endoteliais mediada por VEGF. Esses achados

feitos pelo grupo de Boston combinados aos achados de nosso grupo que mostram atividade anti-angiogênica de heparinas modificadas quimicamente sugerem princípios de design para um inibidor de angiogênese baseado em Bevacizumabe modificado pela adição de heparina nas injeções intravítreas. Por isso, decidimos estudar a interação dessas moléculas em busca de um novo tratamento com maior eficácia. Visamos assim aumentar a inibição da angiogênese mediada pelo bloqueio do VEGF pela combinação de anticorpo monoclonal anti-VEGF Bevacizumabe já utilizado na clínica com uma HepM que não apresenta atividade anticoagulante ou hemorrágica e apresenta forte atividade anti-angiogênica.

## **1.5 Justificativa**

O estudo de heparinas e heparinóides vem desde quando o programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular foi fundado na UNIFESP na década de 70. O primeiro trabalho publicado demonstrando atividade anti-angiogênica de heparinômiméticos em neovascularização foi em 2010 (Dreyfuss et. al 2010)[37]. Desde então esta linha de pesquisa, que se mostra muito promissora, vem crescendo e novas moléculas derivadas de heparina e heparinômiméticos vêm sendo estudados por nosso grupo.

A Heparina-6-dessulfatada, que é a molécula que estudo com o grupo desde 2018, já mostrou resultados muito interessantes sobre sua eficácia na diminuição da migração, proliferação celular e também diminuição na formação de estruturas do tipo capilar em células endoteliais, além de não alterar a viabilidade dessas células.

Estudos de outros alunos do mesmo grupo mostraram a atividade anti-angiogênica *in vivo* também em modelo de neovascularização de coróide induzida por laser em ratos. Sendo assim, essa HepM é bastante promissora, mostra atividade anti-angiogênica eficaz e maior do que 50% de inibição da neovascularização *in vivo* e *in vitro* e não apresenta atividade anticoagulante ou hemorrágica. Com base nestes dados, nossa hipótese agora é verificar a possível potencialização dos efeitos anti-angiogênicos do anticorpo monoclonal anti-VEGF, o bevacizumabe, utilizado para tratamento de DMRI em combinação com a heparina-6-dessulfatada.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivos gerais**

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a potencialização da ação antiangiogênica do anti-VEGF bevacizumabe pela heparina-6-dessulfatada *in vitro* em culturas de células endoteliais de aorta de coelho, e testar a possível citotoxicidade destes compostos em células de retina humana ARPE-19.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar a potencialização do efeito anti-proliferativo, anti-migratório e anti-angiogênico da Heparina-6-Dessulfatada com Bevacizumabe em células

endoteliais de aorta de coelho (CLPs) e a toxicidade destes compostos em células do Epitélio Pigmentado da Retina Humana (ARPE-19).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Heparinas modificadas quimicamente**

Neste trabalho foi utilizada a Heparina 6-dessulfatada (Hep-6D), uma heparina modificada quimicamente sem atividade anticoagulante. Esta heparina possui diminuída atividade anticoagulante e hemorrágica quando comparada à heparina não fracionada e estudos preliminares de nosso laboratório indicam forte atividade anti-angiogênica. Uma série de reações químicas simples de dessulfatação e N-acetilação (de-O-sulfatação, de- N-sulfatação e re-N-acetilação) foram utilizadas para obtenção desta heparinas sistematicamente modificada seguindo o protocolo de Yates et. al, 2006[38,39]. Assim, esta heparina com quimicamente modificada foi obtida. Dados não publicados de nosso laboratório mostram que esta heparina possui atividade anti-angiogênica e anti-proliferativa de células endoteliais assim como efeito anti-angiogênico *in-vivo* utilizando modelo animal de neovascularização de coróide induzida por laser em ratos Zucker lean.

#### **3.2 Bevacizumabe**

O Bevacizumabe é um anticorpo monoclonal que tem como alvo o VEGF-A, que é o fator que estimula o crescimento das células endoteliais[43]. Ele se liga a essa proteína inibindo o processo de angiogênese. Atualmente é usado no tratamento de diversas doenças degenerativas neovasculares e câncer. Estudos têm demonstrado que os agentes anti-VEGF resultam na regressão de microvasos existentes, normalização da vasculatura madura sobrevivente e inibição do crescimento do vaso e neovascularização.

#### **3.3 Cultura de células endoteliais de aorta de coelho**

Células endoteliais de aorta de coelho (CLPs) foram cultivadas em meio F12 + 10% SFB com penicilina/estreptomicina 2% a cada 100ml de meio, na estufa a 37° e 2,5% de CO<sub>2</sub> . Para o subcultivo foi utilizada uma solução de pancreatina (2,5%) diluída na proporção de 1:10 em EBSS (Earle's Balanced Salt Solution). O meio de cultura foi trocado em dias alternados e o subcultivo realizado quando as células atingiram a confluência na placa.

#### **3.4 Cultura de células do Epitélio Pigmentar da Retina Humana**

Células do Epitélio Pigmentado da Retina Humana (ARPE-19) foram cultivadas em meio DMEM/F12 + 10% de SFB com penicilina/estreptomicina 2% a cada 100ml de meio, na estufa a 37° e 5% de CO<sub>2</sub> . Para o subcultivo foi utilizada uma solução de tripsina diluída na proporção de 1:10 em EBSS. O meio de cultura foi trocado em dias alternados e o subcultivo realizado quando as células estavam confluentes na placa.

#### **3.5 Ensaio de proliferação celular**



O ensaio foi realizado com os dois tipos de célula, CLPs e ARPE-19 da seguinte maneira:

Em placas de 96 poços foram plaqueadas 5000 células CLPs em uma placa e 5000 células ARPE-19 em outra placa, em meio de cultura F12 e F12+DMEM respectivamente com 10% SBF, em triplicata. Após 24h de cultivo foram adicionados ao meio de cultura:

- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,001 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,01 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,1 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 0,025 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 2,5 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,001 mg/mL + Bevacizumabe na concentração 0,25 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,01 mg/mL + Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,1 mg/mL + Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;
- Poços controle com solução salina (PBS).

Após 24h da adição das drogas, o meio foi aspirado da placa e os poços foram lavados com PBS. As células foram fixadas com 100 ul de paraformaldeído 4% em cada poço por 15 minutos. Depois de aspirar o paraformaldeído, foi adicionado 100 ul de metanol por poço e incubado por 20 minutos, e em seguida lavados com 200 microlitros de PBS por 1 vez.

Após a lavagem, as células foram coradas com uma solução de 1 ul de DAPI (ThermoFisher®, 5mg/mL) diluído em 10ml de PBS, sendo 100 microlitros por poço, por 20 minutos no escuro. Após coradas, as células foram lavadas cinco vezes com PBS e levadas ao microscópio InCell Analyzer para contagem e depois análise dos resultados. O equipamento conta os núcleos e os resultados são expressos em quantidade de núcleos por campo. Cada poço possui 9 campos. Os experimentos foram realizados em triplicata. Em seguida os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do pós teste Bonferroni e considerados estatisticamente significativos se  $p < 0,05$ .

### **3.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT**

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com os dois tipos de célula, CLPs e ARPE-19 da seguinte forma:

A citotoxicidade foi determinada utilizando o ensaio de MTT com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Para este ensaio, 5000 células foram semeadas em placas de 96 poços e cultivadas até 80% de confluência.

O meio foi removido e meio fresco contendo 10% de SBF e diferentes quantidades das drogas foram adicionados às células e incubadas por 24h (37°C, 2,5% de CO<sub>2</sub>), nas seguintes concentrações:

- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,001 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,01 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,1 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 0,025 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 2,5 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,001 mg/mL + Bevacizumabe na concentração 0,25 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,01 mg/mL + Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,1 mg/mL + Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;
- Poços controle.

Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e meio isento de soro contendo MTT (0,5 mg/mL) adicionado. Após 2h de incubação, o meio foi removido e as células foram lisadas pela adição de 200 µL/poço de DMSO e a absorbância foi medida a 540 nm com ajuda de um leitor de ELISA. Os experimentos foram realizados em triplicata. Em seguida os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do pós teste Bonferroni e considerados estatisticamente significativos se  $p < 0,05$ .

### **3.7 Formação de estruturas do tipo capilar em Matrigel**

O ensaio de formação de estruturas do tipo capilar em Matrigel foi realizado com células CLPs, da seguinte maneira:

Matrigel foi descongelado em banho de gelo e 70 µL foram plaqueados sobre o fundo de placas de 96 poços e incubados a 37°C durante 4h para a gelificação do Matrigel.

40.000 células endoteliais foram semeadas sobre o Matrigel, e tratadas com as drogas nas seguintes concentrações:

- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,01 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,1 mg/mL;

- Bevacizumabe na concentração de 0,025 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 2,5 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,001 mg/mL + Bevacizumabe na concentração 0,25 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,01 mg/mL + Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,1 mg/mL + Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;
- Poços controle com solução salina (PBS).

As células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> a 2,5% durante 16h. Cada experimento foi realizado em triplicata. A formação das estruturas do tipo capilar em cultura foram examinadas por microscopia de luz invertida na ampliação de 40 vezes.

O comprimento em nm total de estruturas tubulares no Matrigel foi medido e determinadas usando software de análise de imagem (imageJ; NIH, Bethesda, MD, EUA com plugin angiogenesis), e expressos como comprimento em nanômetros do tubo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Em seguida os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do pós teste Bonferroni e considerados estatisticamente significativos se  $p < 0,05$ .

### **3.8 Ensaio de migração Wound Healing Assay**

O ensaio de migração celular foi realizado para os dois tipos celulares estudados: CLPs e ARPE-19. Para isto,  $5 \times 10^4$  células (CLPs ou ARPE-19) foram semeadas em placas de 24 poços. As células foram cultivadas em meio de cultura (F12 para CLPs e F12+DMEM para ARPE-19) contendo 10% de SBF a 37°C em uma atmosfera de 2,5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 80% de confluência. Em seguida, foi realizada uma lesão do tipo risco com o auxílio da ponteira de micropipeta descartável no diâmetro do poço e foram adicionadas diferentes concentrações de drogas logo após a realização da lesão:

- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,01 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,1 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 0,025 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;
- Bevacizumabe na concentração de 2,5 mg/mL;
- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,001 mg/mL + Bevacizumabe na concentração 0,25 mg/mL;

- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,01mg/mL + Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;

- Heparina-6-dessulfatada na concentração de 0,1mg/mL + Bevacizumabe na concentração de 0,25 mg/mL;

- Poços controle.

As células foram cultivadas por 48h e as imagens foram capturadas logo após a lesão (0h), após 24h e 48h de tratamento. A migração foi observada em microscópio de luz invertido, as imagens foram capturadas e as medidas em nm da distância percorrida pelas células em direção ao fechamento da lesão (considerada como migração celular) foram realizadas utilizando o software de análise Image J e os resultados expressos em nm considerando o tamanho da lesão logo após a injúria como 100%.

Para analisar a migração foram calculadas as porcentagens após 24 e 48h e subtraído pelo valor inicial 0h (100%). Os experimentos foram realizados em triplicata. Em seguida os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do pós teste Bonferroni e considerados estatisticamente significativos se  $p < 0,05$ .

### **3.9 Forma de análise dos resultados**

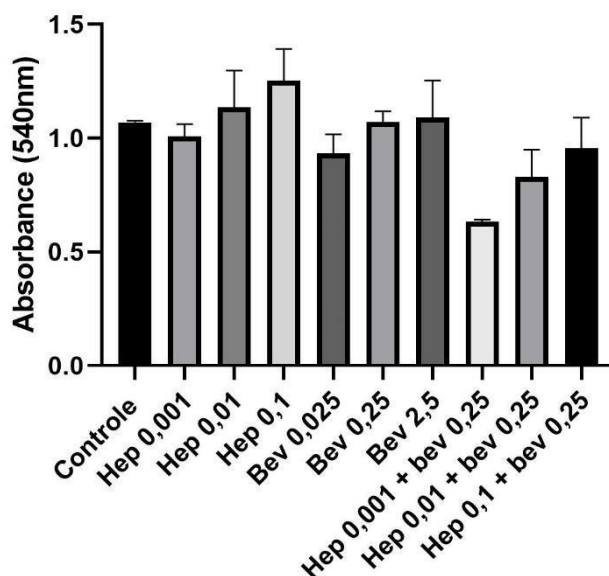
Os resultados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 8.0. A análise estatística foi realizada por teste de ANOVA e pós-teste de Bonferroni e o gráfico foi gerado pelo próprio programa após a análise estatística.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Ensaio de viabilidade celular por MTT em CLPs**

O potencial redox em células viáveis é capaz de reduzir o sal de MTT a um sal de formazam que é pigmentado na cor violeta. Este é um método colorimétrico usado para medir viabilidade celular e citotoxicidade [37]. Após a redução do MTT pelas células viáveis, o sal de formazam é solubilizado e a absorbância é medida em leitor de ELISA. Os experimentos foram realizados em triplicata. Em seguida os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do pós teste Bonferroni e considerados estatisticamente significativos se  $p < 0,05$ .

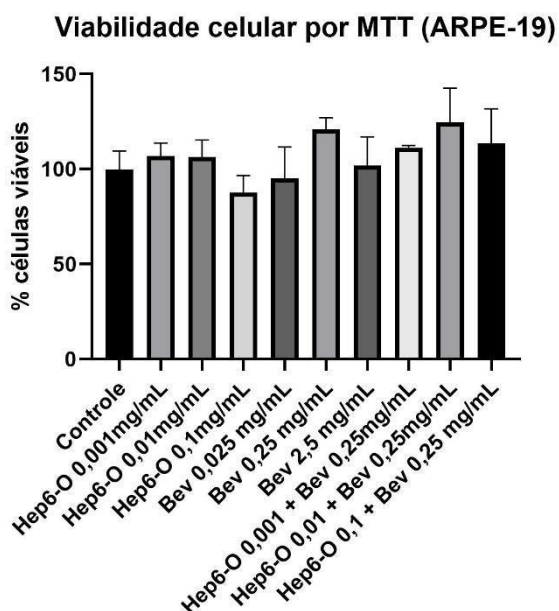
### Viabilidade celular por MTT (CLPs)



**Figura 3.** Gráfico do ensaio de viabilidade celular (MTT) de células endoteliais (CLPs) tratadas com diferentes concentrações de heparina-6-dessulfatada (Hep6D) ou Hep6D+bevacizumabe ou bevacizumabe (bev). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa da viabilidade das CLPs após o tratamento com as diferentes concentrações da Heparina 6-dessulfatada ou Hep6D+bev ou bev, onde  $P > 0,999$ . Ou seja, as drogas não alteram a viabilidade de células endoteliais após o tratamento com essas diversas concentrações.

#### 4.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT em ARPE-19

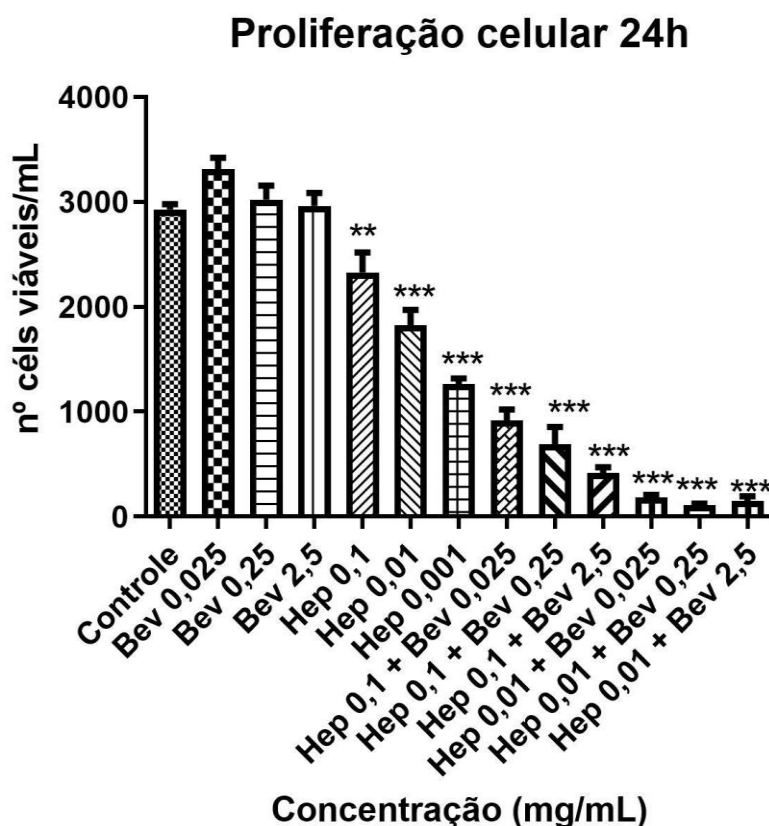


**Figura 4.** Gráfico do ensaio de viabilidade celular (MTT) de células de retina (ARPE-19) tratadas com diferentes concentrações de heparina-6-dessulfatada (Hep6D) ou Hep6D+bevacizumabe ou bevacizumabe (bev). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

Não foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa da viabilidade das células do epitélio pigmentado da retina ARPE-19 após o tratamento com as diferentes concentrações da Heparina 6-Dessulfatada ou Hep6D+bev ou bev. A análise estatística do experimento resultou em  $P > 0,999$ , então, o tratamento com essas diversas concentrações das drogas não altera a viabilidade das células do EPR.

### 4.3 Ensaio de proliferação celular em CLPs

Este ensaio foi realizado para avaliar a capacidade de Hep6D, Hep6D+Bev ou Bev em inibir a proliferação de células endoteliais (CLPs).

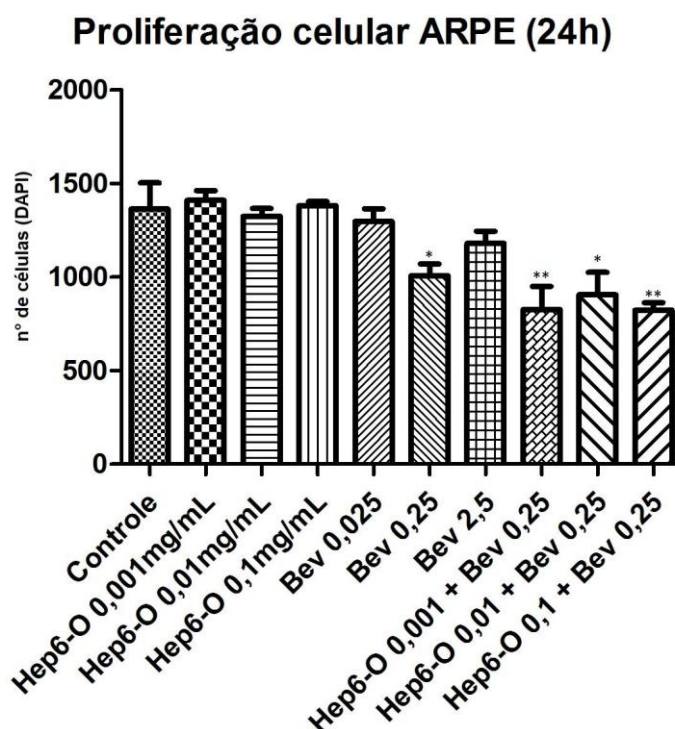


**Figura 5.** Gráfico de ensaio de proliferação celular de células endoteliais de aorta de coelho tratadas com diferentes concentrações de heparina-6-dessulfatada (Hep6D) ou Hep6D+bevacizumabe ou bevacizumabe (bev). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

As três concentrações de Heparina e de Hep6D + Bev resultaram em uma diminuição significativa de proliferação celular nas CLPs. A análise estatística do

experimento resultou em  $P < 0,0001$ . O tratamento com essas diversas concentrações de Heparinas e Hep6D + Bev inibem a estimulação do fator de crescimento dessas células, o que é a principal função de uma droga com potencial ação anti-VEGF[9].

#### 4.4 Ensaio de proliferação celular em ARPE-19



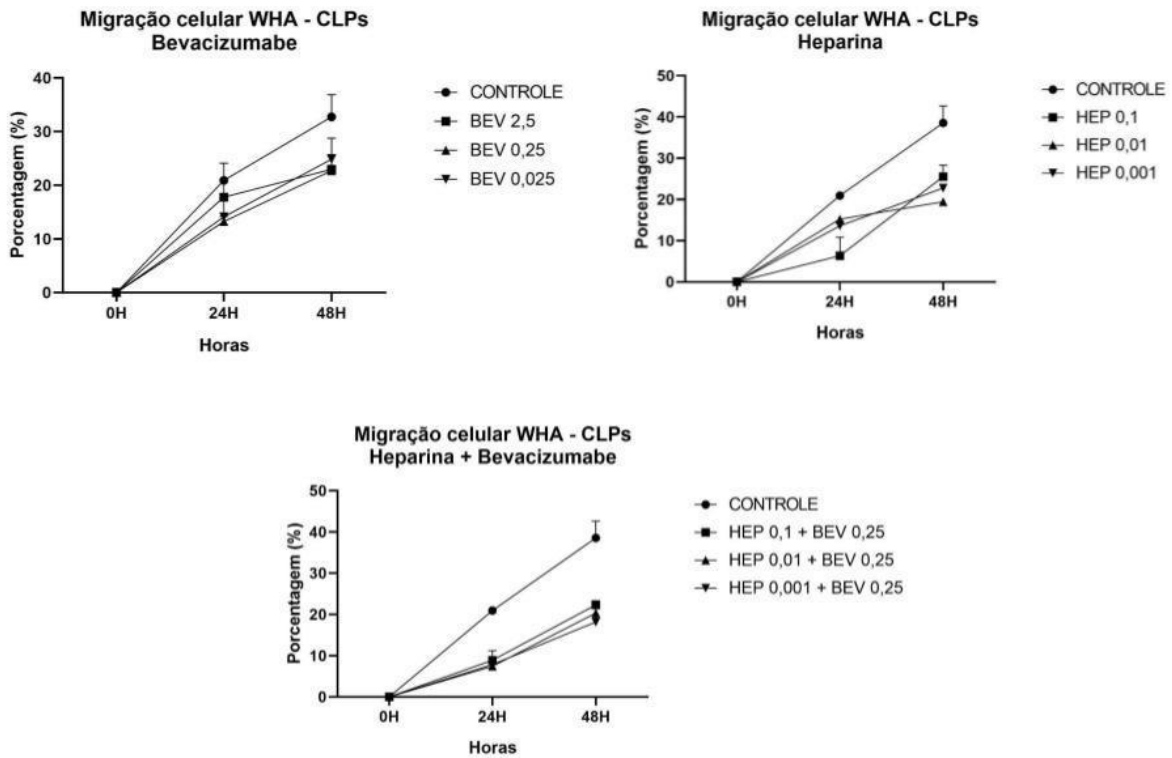
**Figura 6.** Gráfico do experimento de proliferação celular das células ARPE-19 após tratadas com diferentes concentrações de heparina-6-dessulfatada (Hep6D) ou Hep6D+bevacizumabe ou bevacizumabe (bev). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

As três concentrações de Hep 6D+Bev diminuíram significativamente a proliferação das células do EPR. A análise estatística da concentração de Bev 0,25 resultou em  $P < 0,01$  em relação aos poços controle e a análise estatística das três concentrações de Hep 6D + Bev resultaram em  $P < 0,003$  em relação aos poços controle, o que mostra que a Heparina potencializa o efeito do Bevacizumabe nas células ARPE-19 e também nas CLPs como mostramos na figura 5, um resultado promissor uma vez que essa junção de Heparina e Bevacizumabe trás um melhor resultado ao tratamento, principalmente nas células endoteliais.

#### 4.5 Ensaio de migração celular pelo método Wound Healing Assay em CLPs

O ensaio de cicatrização de feridas é um dos métodos para estudar a direção da migração celular *in vitro*. O método mimetiza a migração celular no processo de cicatrização *in vivo*. Os passos básicos envolvem criar uma lesão na monocamada de células endoteliais, capturar imagens no momento da lesão

e em intervalos regulares durante a migração celular para fechar a lesão, e comparar as imagens para quantificar a taxa de migração das células [37].

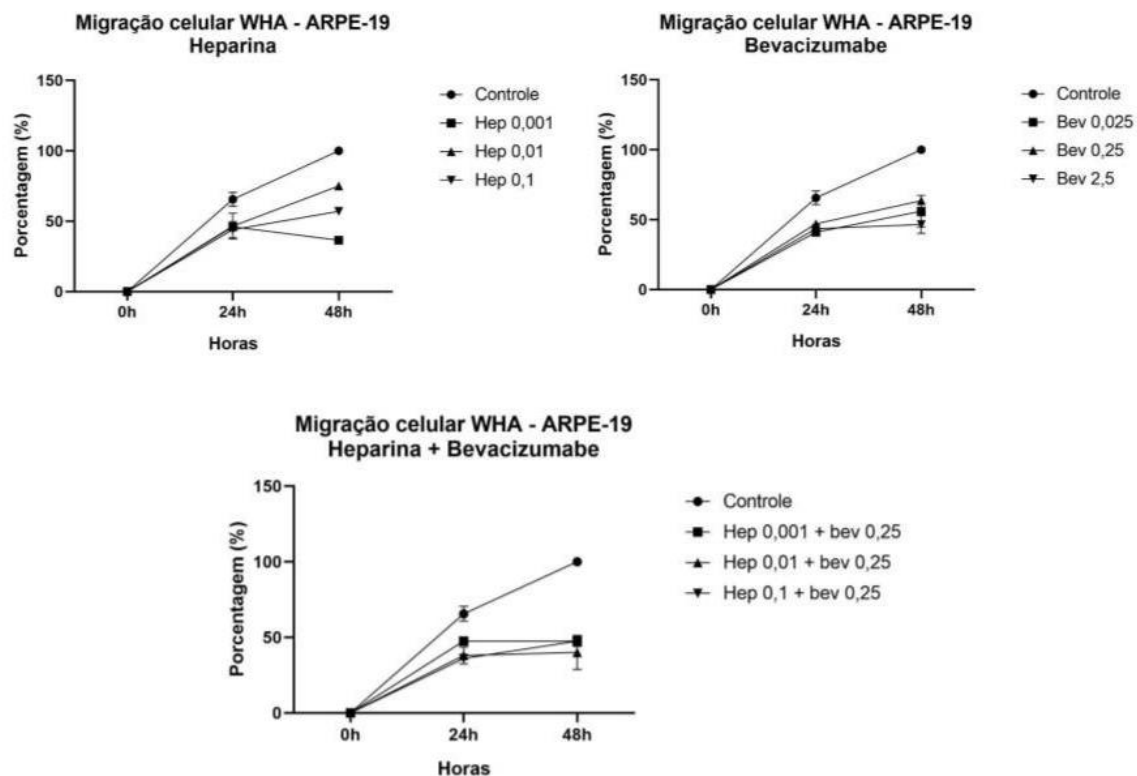


**Figura 7.** Gráficos do experimento de migração celular em CLPs com cada tipo de droga.

Todas as concentrações de Heparina, Bevacizumabe e Hep 6D + Bev diminuem significativamente a migração celular em 24h e 48h em células endoteliais. A análise estatística do experimento resultou em  $P < 0,002$ . Há estudos que mostram que a ativação da migração celular é um dos primeiros acontecimentos críticos na angiogênese[48], então diminuir essa ação é extremamente importante para a eficácia do tratamento.

#### 4.6 Ensaio de migração celular por Wound Healing Assay em células ARPE-19

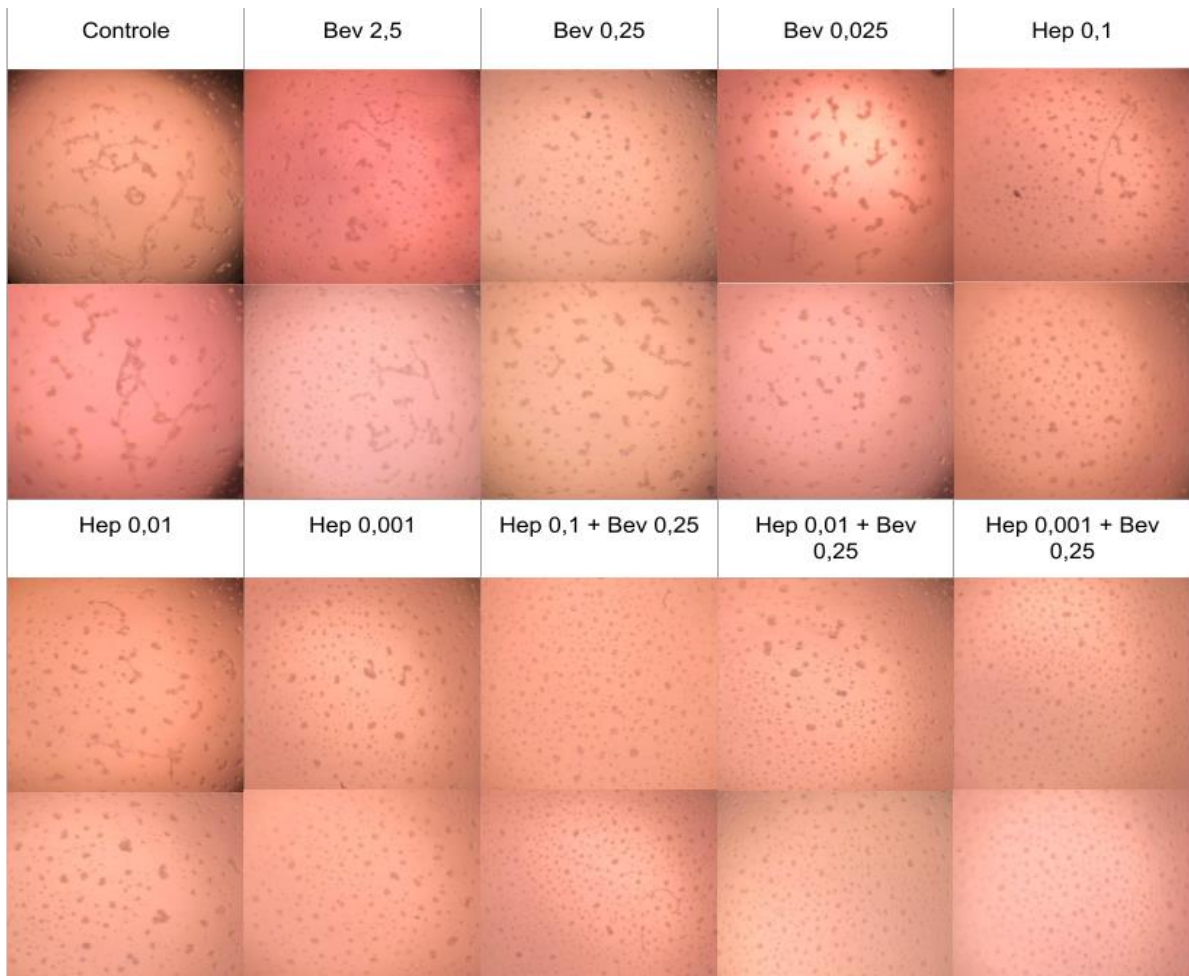




**Figura 8.** Gráficos do experimento de migração celular em ARPE-19 com cada tipo de droga.

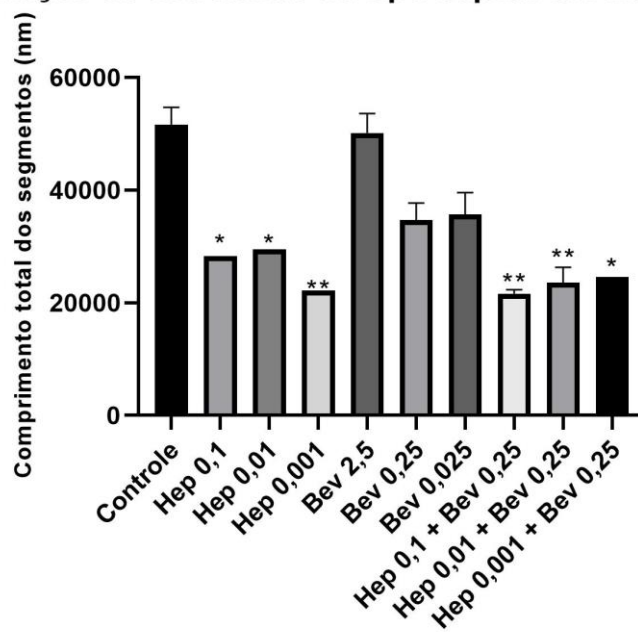
Todas as concentrações de Heparina, Bevacizumabe, Hep 6D + Bev diminuíram a migração celular em ARPE-19. A análise estatística do experimento resultou em  $P < 0,002$ , sendo assim, o tratamento com essas concentrações das drogas obteve um resultado promissor em relação a migração tanto nas células do EPR como nas células endoteliais (como podemos observar na figura 7), mostrando que essas drogas têm potencial para um novo tratamento anti-VEGF.

#### 4.7 Ensaio de formação de estruturas do tipo capilar em Matrigel



**Figura 9.** Imagens do ensaio de formação de estruturas do tipo capilar em Matrigel.

### Formação de estruturas do tipo capilar em Matrigel (CLPs)



**Figura 10.** Gráfico do experimento de formação de estruturas do tipo capilar em CLPs tratadas com diferentes concentrações de heparina-6-dessulfatada (Hep6D) ou Hep6D+bevacizumabe ou bevacizumabe (bev). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste Bonferroni.

As concentrações de Heparina e as três concentrações de Hep-6D+bev diminuíram significativamente a formação de estruturas do tipo capilar em CLPs. A análise estatística do experimento resultou em  $P < 0,0005$ .

É fato que a inflamação ocorre em diversas doenças oculares, e estudos mostram que a angiogênese induz diretamente a fatores inflamatórios [18, 19], pois os macrófagos ativados durante a inflamação secretam enzimas que degradam a MEC, degradando a membrana de Bruch e dando espaço para a formação dos neovasos. Além disso, as células inflamatórias possuem citocinas que induzem a produção de VEGF e outros fatores que favorecem a angiogênese. Alguns estudos associam a inflamação com a progressão da DMRI [16, 17].

Estudos mostram que a heparina interfere com os fatores de crescimento na angiogênese porque se ligam em domínios que estão localizados no fator de crescimento e nos receptores das células [37] e a heparina tem o papel de se ligar na MEC e aumenta a ligação do bevacizumabe ao VEGF [48], potencializando a ação da inibição da angiogênese. O bevacizumabe não apresentou diferença significativa em relação aos poços controle na inibição de formação de estruturas do tipo capilar, o que mostra claramente o quanto a Heparina pode potencializar a ação do tratamento, já que o bevacizumabe não inibiu a formação dessas estruturas.

## 5.0 COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos experimentos *in-vitro* mostraram que a Heparina é muito promissora na potencialização do Bevacizumabe, pois os resultados mostram que a Heparina tem função de melhorar a resposta do tratamento uma vez que o bevacizumabe não inibiu a proliferação das células endoteliais e das células do EPR e não inibiu a formação de estruturas do tipo capilar.

Essa nova droga é de extrema importância para novos tratamentos, pois diminuiria o custo das injeções, tornando o tratamento mais acessível aos pacientes e conseqüentemente trazendo maior adesão, o que gera melhora para a saúde ocular da população.

## 6.0 CONCLUSÕES

As concentrações de Heparina 6-O + Bevacizumabe se mostraram muito promissoras para novos tratamentos, conforme tabela abaixo:

	<b>ARPE-19</b>	<b>CLPs</b>
<b>Viabilidade celular</b>	Nenhuma das concentrações altera	Nenhuma das concentrações altera

<b>Proliferação celular</b>	As três concentrações de Heparina + Bevacizumabe diminuem significativamente a proliferação celular.	Todas as concentrações de Heparina e Heparina + Bevacizumabe diminuem a proliferação celular.
<b>Migração celular</b>	Todas as concentrações de Heparina, Bevacizumabe e Heparina + Bevacizumabe diminuíram a migração celular em 24h e 48h.	Todas as concentrações de Heparina, Bevacizumabe e Heparina + Bevacizumabe diminuíram a migração celular em 24h e 48h.
<b>Formação de estruturas do tipo capilar em Matrigel</b>	-	As concentrações de Heparina e as concentrações de Heparina + Bevacizumabe diminuíram significativamente a formação de estruturas do tipo capilar em CLPs.

**Tabela 1.** Tabela de resultados finais.

## 7.0 REFERÊNCIAS

1. Martins, J.R., et al., Comparison of practical methods for urinary glycosaminoglycans and serum hyaluronan with clinical activity scores in patients with Graves' ophthalmopathy. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. 60(6): p. 726-33.
2. Queiroz, J., Junior, J., Queiroz, F.. Degeneração macular relacionada à idade: considerações histopatológicas. Rev Bras Oftalmol., v. 69, n. 6, p. 400-406, dez. 2010.
3. Pascolini, D., et al., 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. Ophthalmic Epidemiol, 2004. 11(2): p. 67-115.
4. BICAS, H.E.A. and A.A.H. JORGE, Etymological: Fundaments e Appliances. 2007: p. 36.
5. Brito, A.S., et al., Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. Bioorg Med Chem, 2008. 16(21): p. 9588-95.
6. Schmidt-Erfurth U, Kaiser PK, Korobelnik JF et al. Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies. Ophthalmology. 2014 Jan;121(1):193-201.
7. Jager, R.D., W.F. Mieler, and J.W. Miller, Age-related macular degeneration. N Engl J Med, 2008. 358(24): p. 2606-17.

8. Bird, A.C., et al., An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol*, 1995. 39(5): p. 367-74.
9. Gerwins, P., E. Skoldenberg, and L. Claesson-Welsh, Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000. 34(3): p. 185-94.
10. Jain, R.K. and D.G. Duda, Role of bone marrow-derived cells in tumor angiogenesis and treatment. *Cancer Cell*, 2003. 3(6): p. 515-6.
11. da Silva, T., et al., Agentes antitumorais inibidores da angiogênese-Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina 3. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007. 43(1).
12. Nowak, J.Z., Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep*, 2006. 58(3): p. 353-63.
13. Nozaki, M., et al., Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(7): p. 2328-33.
14. Glenn, J.V., et al., Advanced glycation end product (AGE) accumulation on Bruch's membrane: links to age-related RPE dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(1): p. 441-51.
15. Kijlstra, A., E. La Heij, and F. Hendrikse, Immunological factors in the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration. *Ocular Immunol Inflamm*, 2005. 13(1): p. 3-11.
16. Saxe, S.J., et al., Ultrastructural features of surgically excised subretinal neovascular membranes in the ocular histoplasmosis syndrome. *Arch Ophthalmol*, 1993. 111(1): p. 88-95.
17. Grossniklaus, H.E., et al., Histopathologic and ultrastructural features of surgically excised subfoveal choroidal neovascular lesions: submacular surgery trials report no. 7. *Arch Ophthalmol*, 2005. 123(7): p. 914-21.
18. Seddon, J.M., et al., Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration. *JAMA*, 2004. 291(6): p. 704-10.
19. Werb, Z. and S. Gordon, Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J Exp Med*, 1975. 142(2): p. 346-60.
20. Unanue, E.R., et al., Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages. *Am J Pathol*, 1976. 85(2): p. 465-78.
21. Laser photocoagulation of subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol*, 1991. 109(9): p. 1220-31.

22. Schmidt-Erfurth, U., et al., Photodynamic effects on choroidal neovascularization and physiological choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002. 43(3): p. 830-41.
23. Lewis, H., et al., Macular translocation for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: a prospective study. *Am J Ophthalmol*, 1999. 128(2): p. 135-46.
24. Interferon alfa-2a is ineffective for patients with choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. Results of a prospective randomized placebo-controlled clinical trial. Pharmacological Therapy for Macular Degeneration Study Group. *Arch Ophthalmol*, 1997. 115(7): p. 865-72.
25. Rosenfeld, P.J., et al., Maximum tolerated dose of a humanized anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment for treating neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 2005. 112(6): p. 1048-53.
26. Ishida, K., et al., Inhibitory effect of TNP-470 on experimental choroidal neovascularization in a rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999. 40(7): p. 1512-9.
27. Takehana, Y., et al., Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by oral tranilast in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999. 40(2): p. 459-66.
28. Presta, M., et al., Heparin derivatives as angiogenesis inhibitors. *Curr Pharm Des*, 2003. 9(7): p. 553-66.
29. Sanchez, M.C., et al., Effect of retinal laser photocoagulation on the activity of metalloproteinases and the alpha(2)-macroglobulin proteolytic state in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*, 2007. 85(5): p. 644-50.
30. Stieger, K., et al., Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases. *Gene Ther*, 2007. 14(23): p. 1668-73.
31. Riazi-Esfahani, M., et al., Prevention of corneal neovascularization: evaluation of various commercially available compounds in an experimental rat model. *Cornea*, 2006. 25(7): p. 801-5.
32. Sapadin, A.N. and R. Fleischmajer, Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol*, 2006. 54(2): p. 258-65.
33. Lee, C.Z., et al., Doxycycline suppresses cerebral matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis induced by focal hyperstimulation of vascular endothelial growth factor in a mouse model. *Stroke*, 2004. 35(7): p. 1715-9.
34. Hasan, J., et al., Heparin octasaccharides inhibit angiogenesis *in vivo*. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(22): p. 8172-9.

36. Lange, C., et al., Intravitreal injection of the heparin analog 5-amino-2-naphthalenesulfonate reduces retinal neovascularization in mice. *Exp Eye Res*, 2007. 85(3): p. 323-7.
37. Dreyfuss, J.L., et al., A heparin mimetic isolated from a marine shrimp suppresses neovascularization. *J Thromb Haemost*, 2010. 8(8): p. 1828-37.
38. Lima, M.A., et al., Ultra-low-molecular-weight heparins: precise structural features impacting specific anticoagulant activities. *Thromb Haemost*, 2013. 109(3): p. 471-8.
39. Guimond, S.E., J.E. Turnbull, and E.A. Yates, Engineered bio-active polysaccharides from heparin. *Macromol Biosci*, 2006. 6(8): p. 681-6.
40. Paredes-Gamero, E.J., et al., Chemical reduction of carboxyl groups in heparin abolishes its vasodilatory activity. *J Cell Biochem*, 2012. 113(4): p. 1359-67.
41. Taylor RL, C.H., Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide- activated carboxyl groups. *Biochemistry*, 1972. 8: p. 1383-1388.
42. Nagasawa, K., T. Tokuyasu, and Y. Inoue, Studies of the influence of N-substitution in heparin on its anticoagulant activity. *J Biochem*, 1977. 81(4): p. 989-93.
43. Irimura T, N.M., Nicolson GL, Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase (heparanase) of metastatic melanoma cells. *Biochemistry*, 1986: p. 5322-5328.
44. Rej, R., M. Jaseja, and A.S. Perlin, Importance for blood anticoagulant activity of a 2-sulfate group on L-iduronic acid residues in heparin. *Thromb Haemost*, 1989. 61(3): p. 540.
45. S.K. Mukherji. Bevacizumab (Avastin). *AJNR Am J Neuroradiol* 31:235–36 Feb 2010.
46. Kriggendorf, V., Regatieri C. V., Dreyfuss, J., Age-related macular degeneration: a review of current therapies and new treatments. *Arq Bras Oftalmol*. 2020;83(6):552-61.
47. Tsiros, D., Sheehy, C., Pecchia, S., Nugent, M., Heparin potentiates Avastin-mediated inhibition of VEGF binding to fibronectin and rescues Avastin activity at acidic pH. Nov. 2019.
48. Tsiros, D., Sheehy, C., Nugent, M., Heparin–Avastin Complexes Show Enhanced VEGF Binding and Inhibition of VEGF-Mediated Cell Migration. Aug. 2021.

