

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Felipe Mallmann

**PAPEL DE DIFERENTES CITOCINAS E MEDIADORES
CELULARES NA RETINOPATIA DIABÉTICA**

Porto Alegre, 2016

ANEXO B – FOLHA DE ROSTO

Felipe Mallmann

**Papel de Diferentes Citocinas e Mediadores Celulares na
Retinopatia Diabética**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Canani
Co-Orientadores : Profa. Dra. Daisy Crispim
Prof. Dr. Néelson Alexandre Kretzmann Filho

Porto Alegre, 2016

ANEXO C - FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Mallmann, Felipe
Papel de Diferentes Citocinas e Mediadores
Celulares na Retinopatia Diabética / Felipe
Mallmann. -- 2016.
111 f.

Orientador: Luis Henrique Canani.
Coorientadores: Daisy Crispim, Néelson Alexandre
Kretzmann Filho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Retinopatia Diabética. 2. Citocinas. 3.
Inflamação. 4. Neurodegeneração. 5. PEDF. I. Canani,
Luis Henrique, orient. II. Crispim, Daisy,
coorient. III. Kretzmann Filho, Néelson Alexandre,
coorient. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ANEXO D - FOLHA DE APROVAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

ANEXO E – ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs: Advanced Glicose Endproducts
AF: Angiografia Fluoresceínica
ATP: Adenosina Trifosfato ou Adenosine Triphosphate
A1AT: Alpha-1-Antitrypsin
Bcl-2: Gene envolvido na via apoptótica
BHR: Barreira Hemato-Retiniana
BRB: Blood Retinal Barrier
BRECS: Bovine Retinal Endothelial Cells
CC4: Complement 4
cDNA: Complementary Desoxiribonucleic Acid
CO: Controle
CRP: C-Reactive Protein
DCCT: Diabetes Control and Complications Trial
DEPC: Dietilpirocarbonato
DM: Diabetes Mellitus
DME: Diabetic Macular Edema
DMEM: Dubelcco's Modified Eagle Medium
DNA: Desoxiribonucleic Acid
DRS: Diabetic Retinopathy Study
DRCR net: Diabetic Retinopathy Clinical Research Network
ECM: Endothelial Cell Medium
ECV-304: Linhagem Específica de Células HUVECs
EGF: Epidermal Growth Factor
ELISA: Enzime-Linked ImmunSorbent Assay
FAC: Fluorescence Analysis
FGF: Fibroblast Growth Factor
EMD: Edema Macular Diabético
eNOS: Endothelial Nitric Oxide Synthases
EPR: Epitélio Pigmentar da Retina
ER: Endoplasmic Reticulum
ERM: Epirretinal Membrane
ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
GLP-1: Glucagon-Like Peptide One
GLUT-1: Glucose Transporter One
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HG: High Glucose
HRMEC: Human Retinal Microvascular Endothelial Cells

HRECS: Human Retinal Endothelial Cells
HUVECS: Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM: Intercellular Adhesion Molecule
IL-6: Interleukin Six
IL-8: Interleukin Eighth
IL-10: Interleukin Ten
IQR: Interquartile Range
IRE1 α : Inositol-Requiring Protein-One alpha (envolvido no ciclo celular e apoptose)
IRMA: Intraretinal Microvascular Abnormalities
JNK: Jun-N-Terminal Kinase (envolvida na via apoptótica)
LDH: Lactat Deshidrogenase
LG: Low Glucose
Log: Logarítimo
MCBD-131: Meio de Cultivo Celular Específico
MH: Macular Hole
MTT: (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Assay
N/A: Non-applicable
NAD(P)H: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NB: Northern Blot
NF- κ B: Nuclear Factor kappa B
NG: Normal Glucose
N/M: Non-mensurable
NO: Nitric Oxide
NR: Not Reported
NS: Not Specified
OCT: Optical Coherence Tomography
OsG: Oscilation Glucose
PCR: Polimerase Chain Reaction
RT-PCR: Real Time Polimerase Chain Reaction
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PDR: Proliferative Diabetic Retinopathy
PEDF: Pigment Epithelium Derived Factor
PFC: Pan-fotocoagulação
PI: Propidium Iodide
PKC: Protein Kinase C
PPV: Pars Plana Vitrectomy
PTEN: Phosphatase and Tension Homolog
PTIO: 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1oxyl 3-oxide
PTX3: Pentraxine 3
PUMA: p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis

p21: Gene modulador da apoptose
p53: Gene modulador da apoptose
RAGE: Receptor of Advanced Glicose Endproducts
RD: Retinopatia Diabética
RD: Retinal Detachment
RDNP: Retinopatia Diabética Não-Proliferativa
RDP: Retinopatia Diabética Proliferativa
RNA: Ribonucleic Acid
ROS: Reactive Oxygen Species
SAP: Serum Amyloid Protein
SD: Standard Deviation
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
THP-1 monocyte adhesion: Linhagem Celular de Leucócitos
TIGAR: TP53 Induced Glycolysis Regulatory Phosphatase
TLR-2: Toll-Like Receptor-Two
TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha
TNF- β : Tumor Necrosis Factor Beta
TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick and Labeling
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UKPDS: United Kingdon Prospective Diabetes Study
U937 cell adhesion: Linhagem Celular de Leucócitos
VEGF: Vascular Endothelium Growth Factor
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
VH: Vitreous Hemorrhage
WB: Western Blot
ZO-1: Zona Occludens One
8-OHdG: 8-Hidroxydeoxyguanosine (marcador de estresse celular)

ANEXO F – SÍMBOLOS

M: molar

mM: milimolar

mmol/L: milimol por litro

nM: nanomolar

mg/ml: miligramo por mililitro

ng/ml: nanograma por mililitro

pg/ml: picograma por mililitro

U/ml: unidades por mililitro

μg/ml: micrograma por mililitro

μg/μl: micrograma por microlitro

μL: microlitro

μM: micromolar

DEDICATÓRIA:

Dedico esta tese ao meus queridos pai Arnaldo Silvestre Mallmann (*in memoriam*) e Maria Bernadete Kretzmann Mallmann. Obrigado por me trazerem ao mundo, por me cuidarem, por me educarem e me mostrarem o caminho `a seguir nesta vida; sem vocês eu não seria ninguém.

AGRADECIMENTOS:

Aos meus professores Luis Henrique Canani e Daisy Crispim por todo o apoio e conhecimento transmitidos ao longo destes quatro anos, sem os quais não teria conseguido elaborar esta tese.

Ao meu professor e querido primo Néelson Alexandre Kretzmann Filho por todo seu esforço para que nossas idéias se transformassem no trabalho desenvolvido.

Ao meu mentor, mestre e amigo professor Jorge Freitas Esteves que muito me ensinou e estimulou para a pós-graduação ao longo destes mais de quinze anos de convivência.

Aos colegas de sala cirúrgica Paulo Homrich, Glacenir Teresinha de Oliveira, Iomara Aires e todos os residentes de oftalmologia que tanto me apoiaram durante o desenvolvimento do projeto e coleta das amostras.

`As colegas Anelise Decavata Szortyka e Jessica Fassbender pelo auxílio no transporte e manipulação das amostras.

`A Patrícia Koehler por sua competência e paciência durante o importante passo da análise através do método imunomagnético.

`A Pâmela Nique, Marta Cioato e todos do laboratório do Serviço de Endocrinologia e Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, sempre prestativos, me auxiliando, ensinando rotinas de bancada e esclarecendo as minhas inúmeras dúvidas.

Aos meus grandes amigos e `a toda minha família que toleraram minha ausência em diversos momentos que esta tese me privou. Em especial, ao meu querido avô Telmo Kretzmann (*in memoriam*) que enriqueceu minha caminhada com carinho e cultura.

`A minha linda e amada esposa Sandra Marta Callegari que, ao longo destes quatro anos, me apoiou e me deu o maior presente da minha vida: a nossa filha Laura.

“ We are diamonds taken shape”
Adventure Of A Lifetime, Coldplay 2015



SUMÁRIO

Apresentação da Tese	pg 12
Introdução:	pg 14
Uma visão atual sobre a Retinopatia Diabética, Citocinas e Mediadores Celulares	
Capítulo 1:	pg 30
Intravitreal concentration of inflammatory and angiogenic cytokines in patients with proliferative diabetic retinopathy – Original Article	
Capítulo 2:	pg 46
Intravitreal concentration of cellular mediators involved in neurodegeneration and neuroinflammation in patients with proliferative diabetic retinopathy – Original Article	
Capítulo 3:	pg 62
The role of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an experimental model of diabetic endothelial dysfunction – Review Article	
Capítulo 4:	pg 75
Efeito do Fator Derivado do Epitélio Pigmentar (PEDF: Pigment Epithelium-Derived Factor) e do Bevacizumabe em Modelo Experimental de Disfunção Endotelial Diabética – Artigo Original	
Considerações Finais:	pg 91
Anexos:	pg 94
A1. Ilustrações	pg 94
A2. Tabelas	pg 100
A3. Protocolo de Coleta das Amostras Vítreas	pg 105
A4. Protocolos dos Experimentos Celulares	pg 106

APRESENTAÇÃO DA TESE

O leitor irá encontrar no texto que segue uma introdução com a visão atual do autor sobre o tema, seguida de quatro capítulos no formato de artigos para publicação. Nos capítulos 1 e 2, apresentamos dois artigos originais em língua inglesa, gerados pelo primeiro projeto, avaliando pacientes com retinopatia diabética proliferativa (RDP). Neste projeto, tivemos como objetivo mensurar citocinas e mediadores celulares no humor vítreo de pacientes com RDP. No capítulo 3, seguimos em língua inglesa com um artigo de revisão, procurando embasar o desenvolvimento de um modelo experimental de retinopatia diabética. Com este modelo, o objetivo foi comparar o efeito de um fármaco e de um mediador celular com potencial terapêutico. No capítulo 4, justamente, descrevemos os resultados alcançados até o momento com este estudo celular. Após estes capítulos, fazemos considerações finais procurando resumir e interpretar brevemente os achados dos dois projetos. Finalmente, nos anexos, o leitor poderá encontrar figuras, tabelas e protocolos dos experimentos com o intuito de ilustrar os achados e detalhar os métodos utilizados nos projetos.

Ótima leitura,

Felipe Mallmann
Porto Alegre, março de 2016

INTRODUÇÃO

UMA VISÃO ATUAL SOBRE A RETINOPATIA DIABÉTICA

EPIDEMIOLOGIA: O PARADOXO EPIDEMIOLOGICO E OS FATORES GENÉTICOS

A otimização do controle metabólico teve impacto significativo na prevenção primária da retinopatia diabética (RD), reduzindo de 50% para cerca de 25% a prevalência desta complicação após os anos 2000 (1). O avanço nos procedimentos oftalmológicos nas últimas décadas também reduziu de maneira significativa a incidência de déficit visual nestes pacientes (2). Entretanto, estamos vivendo um crescente aumento dos casos de diabetes mellitus (DM) tipo 2, principalmente em países em desenvolvimento (3, 4). Estima-se que teremos cerca de 366 milhões de pacientes com DM em 2030 e cerca de 30 milhões somente no Brasil (4). Dados mais atuais permitem extrapolar que 2 milhões de pessoas necessitem de tratamento ocular no nosso país e a que a RD ainda permanece como uma das principais causas de cegueira no Brasil e no Mundo (3). Vivemos um paradoxo epidemiológico: ao mesmo tempo que o controle clínico permitiu a redução da incidência da complicação nos pacientes com DM, o número crescente de pacientes com DM faz com que a RD tenha enorme impacto sócio-econômico. É fundamental, portanto, a identificação de fatores de risco controláveis com a finalidade de prevenir o desenvolvimento desta complicação. Os fatores de risco mais consistentes e importantes descritos são o tempo de DM, fatores genéticos, gravidez, hiperglicemia crônica, hipertensão, dislipidemia e insuficiência renal (3, 5, 6). Quase todos conseguem ser controlados ou evitados com as terapias atuais, mas mesmo assim porcentagem grande de pacientes continuam evoluindo para fases mais avançadas da RD. Além de discrepâncias no acesso à saúde de diferentes regiões (7, 8) a importância de fatores genéticos tem sido cada vez mais estudada (5). Polimorfismos de diferentes proteínas estiveram associados com maior chance de apresentar RD (9, 10). Talvez a genética abra caminho para entendermos discrepâncias entre pacientes com controle metabólico semelhantes mas com manifestações de complicações e gravidades diferentes.

FISIOPATOGENIA: HIPERGLICEMIA E O DESBALANÇO DE CITOCINAS

A retina é um dos tecidos mais vascularizados do corpo humano e a troca de nutrientes e metabólitos é controlada de maneira altamente especializada por uma barreira hemato-retiniana (BHR) externa e interna (11, 12). A BHR interna é composta pelas *tight junctions* (junções apertadas) do endotélio vascular e por outras células (pericitos e células gliais), formando uma unidade neurovascular com íntimo contato anatômico e metabólico (1, 11-14). Isto permite que a transdução e transmissão do sinal no tecido retiniano ocorra de maneira estritamente controlada e seja conduzida pelo nervo óptico até o córtex occipital (1, 14). Nesta região do sistema nervoso central (SNC) a informação captada, modulada e transmitida pela retina e nervo óptico, será processada e reconhecida, permitindo, portanto a visão (1).

Na retinopatia diabética, a hiperglicemia crônica altera esta homeostasia local, causando perda da BHR interna e neovascularização patológica (1, 15). O extravasamento dos conteúdos do plasma, gera edema da retina e interfere na função neural, reduzindo a visão (1, 13, 16). O surgimento de neovasos patológicos (sem uma BHR madura) associados a um processo fibroglial causa hemorragia vítrea e descolamento tracional da retina, gerando obstrução para o processamento visual e dano direto ao tecido retiniano (17).

As principais alterações histopatológicas observadas em pacientes e modelos experimentais apontam para a apoptose celular (endotélio, pericitos, e células neurais), espessamento da membrana basal e formação de microaneurismas (16, 18-20). Com isto, temos um remodelamento de toda a trama vascular da retina, levando à oclusão e perda dos capilares (20, 21). Este processo continuado causa hipóxia local, neurodegeneração, disfunção da BHR e um ciclo vicioso inflamatório (1, 19). Temos, portanto, a migração de diversas células de defesas para o tecido neural e o desbalanço entre citocinas que controlam a permeabilidade e a angiogênese (15, 22-25).

Dentre estas, o Fator de Crescimento Vascular do Endotélio (VEGF: Vascular Endothelium Growth Factor) é o mediador mais estudado e identificado na fisiopatogenia da RD (26-28). O VEGF estimula a permeabilidade vascular e o surgimento de neovasos, estando aumentado no vítreo de pacientes com edema macular diabético (EMD) e retinopatia diabética proliferativa (RDP) (24, 28-36).

O tratamento com fotocoagulação a laser está associado a redução dos seus níveis e regressão dos neovasos (27). Modelos experimentais celulares e em animais confirmaram a ligação entre a hiperglicemia e a síntese de VEGF (37-41). Além disso, o bloqueio desta citocina em ensaios clínicos demonstrou ótimos resultados terapêuticos com a redução da evolução da doença e a melhora da visão na maioria dos pacientes (42-45).

Dentre as citocinas protetoras, o Fator Derivado do Epitélio Pigmentar (PEDF: Pigment Epithelium Growth Factor) é o mais caracterizado e estudado, exercendo atividades neuroprotetoras, anti-permeabilidade vascular e anti-angiogênicas (24, 46-54). O PEDF atua bloqueando a ação do VEGF ao interferir em algumas vias de sinalização celular e a hiperglicemia reduz sua síntese protéica em modelos experimentais (46, 50, 55-58). Alguns trabalhos em humanos também demonstraram que pacientes com EMD e RDP apresentam níveis reduzidos desta citocina (23, 29, 31, 33, 59). Entretanto, por limitações farmacocinéticas e farmacodinâmicas até o momento não temos resultados de ensaios clínicos com o uso do PEDF no tratamento da RD(60-63).

Nos últimos anos, várias teorias foram descritas para caracterizar os passos moleculares que levam a RD (1, 11, 13, 14, 20, 64, 65). Entretanto, salvo pela terapia anti-VEGF, os estudos clínicos não conseguiram reproduzir de maneira significativa os resultados experimentais (15, 19, 20, 66, 67). Acredita-se que ocorra um grande influxo de glicose no endotélio vascular, pois estas células contam com transportadores de glicose independentes da ativação pela insulina (GLUT-1: Glucose Transporter-1)(1, 14, 19, 65, 67). A alta disponibilidade de glicose intracelular aumenta a produção de radicais livres, ativa rotas alternativas e consome co-fatores importantes para combater as espécies reativas de oxigênio (1, 14, 19, 65, 67). Além disso, a grande disponibilidade de glicose ocasiona a ligação deste carboidrato com proteínas e lipídeos, alterando a função destes e formando produtos avançados da glicação (AGEs: Advanced Glicose Endproducts) (1, 14, 19, 65, 67). Todos estes fatores levam a uma disfunção generalizada da função celular, ativando vias moleculares apoptóticas, inflamatórias e um desbalanço na expressão de diversas citocinas e mediadores celulares (1, 14, 19, 25, 65, 67).

DIAGNÓSTICO: O PAPEL DOS ACHADOS VASCULARES

O diagnóstico da RD baseia-se atualmente em achados de dano vascular observados no exame de fundo de olho (68, 69). O diagnóstico, portanto é clínico, apesar de exames complementares como a angiografia fluoresceínica (AF), a ultrassonografia e a tomografia de coerência óptica (OCT) serem importantes para guiar a estratégia terapêutica e esclarecer dúvidas em relação ao exame clínico (68-72).

O padrão ouro estabelecido pelo estudo ETDRS é a análise da retinografia em sete campos pré-determinados, contemplando boa parte da área da retina (68, 73-75). Estudos demonstraram que, conforme o método empregado na avaliação, podemos dispor de sensibilidade e especificidades variáveis, principalmente em relação ao conhecimento do avaliador (75-81). A oftalmoscopia direta, por exemplo, exige experiência do examinador, tendo limitações e acurácia inferior à retinografia (76, 82, 83). A retinografia digital tem sido empregada em nível populacional e sob a forma de telemedicina, atingindo reprodutibilidade e concordâncias adequadas quando avaliadores capacitados realizam as leituras das imagens (78, 80, 84-87). Entretanto, a biomicroscopia de fundo apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes aos sete campos retinográficos do ETDRS e é o método mais utilizado por oftalmologistas para o diagnóstico da RD (79, 88).

Os achados fundoscópicos incluem a presença de microaneurismas, hemorragias profundas e superficiais, exudatos duros, manchas algodinosas, IRMAS (Intraretinal Microvascular Abnormalities), alterações venosas (ensalsichamento venoso, veias em rosário), neovasos, hemorragia vítrea, descolamento tracional da retina (68, 69, 74, 89). Conforme a presença destas alterações, podemos classificar a RD em retinopatia diabética não proliferativa (RDNP: sem a presença de neovascularização) ou em RDP (retinopatia diabética proliferativa: com a presença de neovascularização)(68, 69). Assim como na prática clínica, utilizamos nesta tese a classificação internacional simplificada proposta em 2003 (69):

- 1) RDNP leve: presença apenas de microaneurismas

- 2) RDNP moderada: mais do que microaneurismas e sem critérios para grave
- 3) RDNP grave: presença de diversas hemorragias em todos os quatro quadrantes (cerca de 20 hemorragias significativas por quadrante), pelo menos dois quadrantes com alterações venosas ou pelo menos um quadrante com IRMA (regra 4:2:1)
- 4) RDP: presença de neovascularização ou hemorragia vítrea por RD.

TRATAMENTO: CONTROLE METABÓLICO, LASER E A ERA ANTI-VEGF

O tratamento da RD envolve o controle de fatores de risco modificáveis (controle metabólico) e terapias oculares específicas para evitar a evolução da doença e a perda visual (1, 6, 68, 90). Os grandes estudos publicados na década de 90 (DCCT e UKPDS) comprovaram que o controle intensivo da glicemia previne a incidência e a evolução da RD para estágios mais avançados (91-93). Outros estudos, também mostraram benefício do controle da hipertensão arterial sistêmica na evolução da RD (94-97). Já o controle da dislipidemia tem menor impacto na prevenção da RD, mas parece ter benefício nos casos de edema macular (6, 97).

Estudos da década de 70 e 80 (DRS e ETDRS) comprovaram o papel protetor da fotocoagulação a laser, reduzindo em cerca de 50% o dano visual nos pacientes com RDP e EMD (68, 98). Entretanto, existem diferenças importantes na técnica quando tratamos a RDP e o EMD (1, 68). No caso da RDP a pan-fotocoagulação (PFC) da retina consiste na ablação de praticamente metade do tecido retiniano, reduzindo o estímulo isquêmico e a síntese de VEGF (1, 68, 99). Com isto, temos a involução de neovasos e evitamos a hemorragia vítrea, o descolamento tracional e o glaucoma neovascular (99). No EMD, o objetivo é fotocoagular áreas de espessamento retiniano e coagular microaneurismas ativos (1, 98-103). Com o fechamento dos microaneurismas, temos um reestabelecimento da BHR e a absorção do edema macular (1, 12, 103). O efeito terapêutico da coagulação do tecido retiniano nas áreas de espessamento é menos compreendida, mas acredita-se que o laser gere uma modificação metabólica local, alterando o fluxo sanguíneo local, estimulando a

síntese de citocinas protetoras e redução de fatores pró-permeabilidade. Contudo, apesar de evitar a evolução da doença, a fotocoagulação a laser causa um dano irreversível ao tecido retiniano e na maioria das vezes não melhorava a visão (68, 98, 103). Atualmente novas estratégias de tratamento e comprimentos de onda têm sido utilizados, tentando minimizar o dano ao tecido retiniano e procurando manter os benefícios visuais (100, 104).

Entretanto, o descobrimento do papel do VEGF na fisiopatogenia da doença, modificou este paradigma, trazendo o desenvolvimento de fármacos capazes de bloquear a ação desta citocina (1, 27, 37, 66, 105). Diversos ensaios clínicos randomizados demonstraram que a terapia anti-VEGF combinada ou não ao laser não só reduziu o edema macular como melhorou a visão dos pacientes em cerca de 45% dos casos (43-45, 106-111). O tratamento consiste na injeção intravítrea de medicamentos contendo fração de anticorpos (Ranibiumabe), anticorpos (Bevacizumabe) ou moléculas de fusão (Aflibercept) que penetram no tecido retiniano e bloqueiam o VEGF livre, evitando seus efeitos de permeabilidade vascular e angiogênese (110, 112). Apesar da baixa incidência de efeitos adversos sistêmicos e locais, a terapia deve ser continuada indefinidamente conforme a resposta clínica com intervalos pelo menos mensais (110). Dados destes estudos apontam para uma média de oito aplicações no primeiro ano de tratamento, reduzindo para 03 aplicações no segundo ano e 01 no terceiro ano (106, 110). Estudo recente demonstrou que o ranibizumabe também pode ser uma alternativa no tratamento da RDP, não sendo inferior a PFC ao longo de dois anos de acompanhamento (113). Contudo, ainda existem dúvidas quanto ao efeito do bloqueio do VEGF a longo prazo, pois esta citocina também tem atividades neuroprotetoras (1, 19, 37, 66, 113, 114). Além disso, cerca de 30 a 40% dos pacientes não tem melhora da acuidade visual com o tratamento e 5 a 10% evoluem para perda visual (106, 110, 111, 115). Entretanto, estes medicamentos já tornaram-se o padrão ouro para o tratamento do edema macular diabético e hoje vivemos a era anti-VEGF.

REFERÊNCIAS:

1. Antonetti, D.A., R. Klein, and T.W. Gardner, *Diabetic retinopathy*. N Engl J Med, 2012. **366**(13): p. 1227-39.
2. Klein, R., et al., *Changes in visual impairment prevalence by period of diagnosis of diabetes: the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy*. Ophthalmology, 2009. **116**(10): p. 1937-42.
3. Yau, J.W., et al., *Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy*. Diabetes Care, 2012. **35**(3): p. 556-64.
4. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1047-53.
5. Esteves, J., et al., *[Diabetic retinopathy risk factors]*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2008. **52**(3): p. 431-41.
6. Mohamed, Q., M.C. Gillies, and T.Y. Wong, *Management of diabetic retinopathy: a systematic review*. JAMA, 2007. **298**(8): p. 902-16.

7. Escarião, P.H., et al., [*Epidemiology and regional differences of diabetic retinopathy in Pernambuco, Brazil*]. Arq Bras Oftalmol, 2008. **71**(2): p. 172-5.
8. Jost, B.S., et al., [*Prevalence of diabetic retinopathy in patients affected by type 2 diabetes mellitus in the city of Luzerna--SC*]. Arq Bras Oftalmol, 2010. **73**(3): p. 259-65.
9. Brondani, L.A., et al., *The UCP1 -3826A/G polymorphism is associated with diabetic retinopathy and increased UCP1 and MnSOD2 gene expression in human retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(12): p. 7449-57.
10. Ferreira, F.N., et al., *Association study of sorbitol dehydrogenase -888G>C polymorphism with type 2 diabetic retinopathy in Caucasian-Brazilians*. Exp Eye Res, 2013. **115**: p. 140-3.
11. Antonetti, D.A., et al., *Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy*. Semin Ophthalmol, 1999. **14**(4): p. 240-8.
12. Klaassen, I., C.J. Van Noorden, and R.O. Schlingemann, *Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions*. Prog Retin Eye Res, 2013. **34**: p. 19-48.
13. Gardner, T.W., et al., *Diabetic retinopathy: more than meets the eye*. Surv Ophthalmol, 2002. **47 Suppl 2**: p. S253-62.
14. Antonetti, D.A., et al., *Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease*. Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2401-11.
15. Semeraro, F., et al., *Diabetic Retinopathy: Vascular and Inflammatory Disease*. J Diabetes Res, 2015. **2015**: p. 582060.
16. Abcouwer, S.F. and T.W. Gardner, *Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1311**: p. 174-90.
17. Campochiaro, P.A., *Ocular neovascularization*. J Mol Med (Berl), 2013. **91**(3): p. 311-21.
18. Barber, A.J., T.W. Gardner, and S.F. Abcouwer, *The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(2): p. 1156-63.
19. Simo, R. and C. Hernandez, *Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence*. Prog Retin Eye Res, 2015.

20. Eisma, J.H., J.E. Dulle, and P.E. Fort, *Current knowledge on diabetic retinopathy from human donor tissues*. World J Diabetes, 2015. **6**(2): p. 312-20.
21. Byeon, S.H., et al., *New insights into the pathoanatomy of diabetic macular edema: angiographic patterns and optical coherence tomography*. Retina, 2012. **32**(6): p. 1087-99.
22. Whitmire, W., et al., *Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far*. Mol Vis, 2011. **17**: p. 300-8.
23. Funatsu, H., et al., *Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2009. **116**(1): p. 73-9.
24. McAuley, A.K., et al., *Vitreous biomarkers in diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis*. J Diabetes Complications, 2014. **28**(3): p. 419-25.
25. Abcouwer, S.F., *Angiogenic Factors and Cytokines in Diabetic Retinopathy*. J Clin Cell Immunol, 2013. **Suppl 1**(11).
26. Praidou, A., et al., *Vitreous and serum levels of platelet-derived growth factor and their correlation in patients with proliferative diabetic retinopathy*. Curr Eye Res, 2009. **34**(2): p. 152-61.
27. Aiello, L.P., et al., *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders*. N Engl J Med, 1994. **331**(22): p. 1480-7.
28. Valiatti, F.B., et al., *[The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis and diabetic retinopathy]*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2011. **55**(2): p. 106-13.
29. Funatsu, H., et al., *Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2006. **113**(2): p. 294-301.
30. Miller, J.W., et al., *Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model*. Am J Pathol, 1994. **145**(3): p. 574-84.
31. Ogata, N., et al., *Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy*. Am J Ophthalmol, 2002. **134**(3): p. 348-53.
32. Maier, R., et al., *Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 637-43.

33. Murugeswari, P., et al., *Proinflammatory cytokines and angiogenic and anti-angiogenic factors in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy and eales' disease*. *Retina*, 2008. **28**(6): p. 817-24.
34. Wakabayashi, Y., et al., *Correlation of vascular endothelial growth factor with chemokines in the vitreous in diabetic retinopathy*. *Retina*, 2010. **30**(2): p. 339-44.
35. Suzuki, Y., et al., *Expression profiles of cytokines and chemokines in vitreous fluid in diabetic retinopathy and central retinal vein occlusion*. *Jpn J Ophthalmol*, 2011. **55**(3): p. 256-63.
36. Bromberg-White, J.L., et al., *Identification of VEGF-independent cytokines in proliferative diabetic retinopathy vitreous*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013. **54**(10): p. 6472-80.
37. Penn, J.S., et al., *Vascular endothelial growth factor in eye disease*. *Prog Retin Eye Res*, 2008. **27**(4): p. 331-71.
38. Behzadian, M.A., et al., *VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor*. *FASEB J*, 2003. **17**(6): p. 752-4.
39. El-Remessy, A.B., et al., *Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(6): p. 1995-2004.
40. El-Remessy, A.B., et al., *Diabetes-induced superoxide anion and breakdown of the blood-retinal barrier: role of the VEGF/uPAR pathway*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e71868.
41. Lee, C.H., et al., *High glucose induces human endothelial dysfunction through an Axl-dependent mechanism*. *Cardiovasc Diabetol*, 2014. **13**: p. 53.
42. Beck, R.W., et al., *Three-year follow-up of a randomized trial comparing focal/grid photocoagulation and intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema*. *Arch Ophthalmol*, 2009. **127**(3): p. 245-51.
43. Massin, P., et al., *Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE Study): a 12-month, randomized, controlled, double-masked, multicenter phase II study*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(11): p. 2399-405.
44. Nguyen, Q.D., et al., *Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE*. *Ophthalmology*, 2012. **119**(4): p. 789-801.

45. Elman, M.J., et al., *Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema*. *Ophthalmology*, 2010. **117**(6): p. 1064-1077.e35.
46. Yoshida, Y., et al., *Protective role of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in early phase of experimental diabetic retinopathy*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2009. **25**(7): p. 678-86.
47. Stellmach, V., et al., *Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(5): p. 2593-7.
48. Sheikpranbabu, S., et al., *Pigment epithelium-derived factor inhibits vascular endothelial growth factor-and interleukin-1beta-induced vascular permeability and angiogenesis in retinal endothelial cells*. *Vascul Pharmacol*, 2010. **52**(1-2): p. 84-94.
49. Seki, R., et al., *Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits survival and proliferation of VEGF-exposed multiple myeloma cells through its anti-oxidative properties*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **431**(4): p. 693-7.
50. Yamagishi, S., et al., *Pigment epithelium-derived factor inhibits vascular endothelial growth factor-induced vascular hyperpermeability both in vitro and in vivo*. *J Int Med Res*, 2007. **35**(6): p. 896-9.
51. He, X., et al., *PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases*. *Clin Sci (Lond)*, 2015. **128**(11): p. 805-23.
52. Cai, J., et al., *PEDF regulates vascular permeability by a gamma-secretase-mediated pathway*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e21164.
53. Yang, J., et al., *Antipermeability function of PEDF involves blockade of the MAP kinase/GSK/beta-catenin signaling pathway and uPAR expression*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. **51**(6): p. 3273-80.
54. Unterlauff, J.D., et al., *Enhanced survival of retinal ganglion cells is mediated by Muller glial cell-derived PEDF*. *Exp Eye Res*, 2014. **127**: p. 206-14.
55. Zucchiatti, I., et al., *Intravitreal dexamethasone implant in patients with persistent diabetic macular edema*. *Ophthalmologica*, 2012. **228**(2): p. 117-22.
56. Ide, Y., et al., *Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end product-elicited mesangial cell damage by blocking NF-kappaB activation*. *Microvasc Res*, 2010. **80**(2): p. 227-32.

57. Nakashima, S., T. Matsui, and S. Yamagishi, *Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks high glucose-induced inflammatory reactions in endothelial cells through its anti-oxidative properties*. *Int J Cardiol*, 2013. **168**(3): p. 3004-6.
58. Zhang, S.X., et al., *Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy*. *J Mol Endocrinol*, 2006. **37**(1): p. 1-12.
59. Duh, E.J., et al., *Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor: implications for ocular angiogenesis*. *Am J Ophthalmol*, 2004. **137**(4): p. 668-74.
60. Liu, Y., et al., *Pigment epithelium-derived factor (PEDF) peptide eye drops reduce inflammation, cell death and vascular leakage in diabetic retinopathy in Ins2(Akita) mice*. *Mol Med*, 2012. **18**: p. 1387-401.
61. Liu, X., H.H. Chen, and L.W. Zhang, *Potential therapeutic effects of pigment epithelium-derived factor for treatment of diabetic retinopathy*. *Int J Ophthalmol*, 2013. **6**(2): p. 221-7.
62. Wang, L., et al., *Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor*. *Mol Ther*, 2003. **8**(1): p. 72-9.
63. Yu, H., L. Chen, and J. Jiang, *Administration of pigment epithelium-derived factor delivered by adeno-associated virus inhibits blood-retinal barrier breakdown in diabetic rats*. *Mol Vis*, 2010. **16**: p. 2384-94.
64. Ola, M.S., et al., *Neurodegeneration and neuroprotection in diabetic retinopathy*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(2): p. 2559-72.
65. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
66. Titchenell, P.M. and D.A. Antonetti, *Using the Past to Inform the Future: Anti-VEGF Therapy as a Road Map to Develop Novel Therapies for Diabetic Retinopathy*. *Diabetes*, 2013. **62**(6): p. 1808-15.
67. Robinson, R., et al., *Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals*. *Dis Model Mech*, 2012. **5**(4): p. 444-56.
68. Ophthalmology, A.A.o., *American Academy of Ophthalmology Retina Panel. Preferred Practice Pattern Guidelines. Diabetic Retinopathy*. 2008 (4th printing 2012), American Academy of Ophthalmology: São Francisco, CA.

69. Wilkinson, C.P., et al., *Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales*. *Ophthalmology*, 2003. **110**(9): p. 1677-82.
70. Massin, P., et al., *Optical coherence tomography: a key to the future management of patients with diabetic macular oedema*. *Acta Ophthalmol Scand*, 2006. **84**(4): p. 466-74.
71. Yeung, L., et al., *Correlation between spectral domain optical coherence tomography findings and fluorescein angiography patterns in diabetic macular edema*. *Ophthalmology*, 2009. **116**(6): p. 1158-67.
72. Bolz, M., et al., *A systematic correlation of angiography and high-resolution optical coherence tomography in diabetic macular edema*. *Ophthalmology*, 2009. **116**(1): p. 66-72.
73. Klein, B.E. and R. Klein, *Gravidity and diabetic retinopathy*. *Am J Epidemiol*, 1984. **119**(4): p. 564-9.
74. Klein, B.E., et al., *Diabetic retinopathy. Assessment of severity and progression*. *Ophthalmology*, 1984. **91**(1): p. 10-7.
75. Vujosevic, S., et al., *Screening for diabetic retinopathy: 1 and 3 nonmydriatic 45-degree digital fundus photographs vs 7 standard early treatment diabetic retinopathy study fields*. *Am J Ophthalmol*, 2009. **148**(1): p. 111-8.
76. Farley, T.F., et al., *Accuracy of primary care clinicians in screening for diabetic retinopathy using single-image retinal photography*. *Ann Fam Med*, 2008. **6**(5): p. 428-34.
77. Ryder, B., *Screening for diabetic retinopathy*. *BMJ*, 1995. **311**(6999): p. 207-8.
78. Aptel, F., et al., *Screening of diabetic retinopathy: effect of field number and mydriasis on sensitivity and specificity of digital fundus photography*. *Diabetes Metab*, 2008. **34**(3): p. 290-3.
79. Rudnisky, C.J., et al., *High-resolution stereoscopic digital fundus photography versus contact lens biomicroscopy for the detection of clinically significant macular edema*. *Ophthalmology*, 2002. **109**(2): p. 267-74.
80. Silva, P.S., et al., *Nonmydriatic ultrawide field retinal imaging compared with dilated standard 7-field 35-mm photography and retinal specialist examination for evaluation of diabetic retinopathy*. *Am J Ophthalmol*, 2012. **154**(3): p. 549-559 e2.

81. Sundling, V., P. Gulbrandsen, and J. Straand, *Sensitivity and specificity of Norwegian optometrists' evaluation of diabetic retinopathy in single-field retinal images - a cross-sectional experimental study*. BMC Health Serv Res, 2013. **13**: p. 17.
82. Siu, S.C., et al., *Effectiveness of non-mydratic retinal photography and direct ophthalmoscopy in detecting diabetic retinopathy*. Hong Kong Med J, 1998. **4**(4): p. 367-370.
83. O'Hare, J.P., et al., *Adding retinal photography to screening for diabetic retinopathy: a prospective study in primary care*. BMJ, 1996. **312**(7032): p. 679-82.
84. Lim, J.I., et al., *A comparison of digital nonmydratic fundus imaging with standard 35-millimeter slides for diabetic retinopathy*. Ophthalmology, 2000. **107**(5): p. 866-70.
85. Cavallerano, J.D., et al., *Imager evaluation of diabetic retinopathy at the time of imaging in a telemedicine program*. Diabetes Care, 2012. **35**(3): p. 482-4.
86. Soliman, A.Z., et al., *Ultra-wide field retinal imaging in detection, classification, and management of diabetic retinopathy*. Semin Ophthalmol, 2012. **27**(5-6): p. 221-7.
87. Malerbi, F.K., et al., *Comparison between binocular indirect ophthalmoscopy and digital retinography for diabetic retinopathy screening: the multicenter Brazilian Type 1 Diabetes Study*. Diabetol Metab Syndr, 2015. **7**: p. 116.
88. Molina-Fernandez, E., et al., *[Inter-observer variability in the diagnosis and classification of diabetic retinopathy through biomicroscopy]*. Arch Soc Esp Oftalmol, 2008. **83**(1): p. 23-8.
89. Bressler, N.M., et al., *Observational study of subclinical diabetic macular edema*. Eye (Lond), 2012. **26**(6): p. 833-40.
90. Lang, G.E., *Pharmacological treatment of diabetic retinopathy*. Ophthalmologica, 2007. **221**(2): p. 112-7.
91. *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group*. N Engl J Med, 1993. **329**(14): p. 977-86.
92. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group*. Lancet, 1998. **352**(9131): p. 837-53.

93. *Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34).* UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*, 1998. **352**(9131): p. 854-65.
94. *Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38.* UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*, 1998. **317**(7160): p. 703-13.
95. Clayton, N.S. and N.J. Emery, *What do jays know about other minds and other times?*, in *Neurobiology of Umwelt: How Living Beings Perceive the World*, A. Berthoz and Y. Christen, Editors. 2009, Springer-Verlag Berlin: Berlin. p. 109-123.
96. Group, A.S., et al., *Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes.* *N Engl J Med*, 2010. **363**(3): p. 233-44.
97. Hammes, H.P., *Optimal treatment of diabetic retinopathy.* *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2013. **4**(2): p. 61-71.
98. Neubauer, A.S. and M.W. Ulbig, *Laser treatment in diabetic retinopathy.* *Ophthalmologica*, 2007. **221**(2): p. 95-102.
99. *Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) findings, DRS Report Number 8.* The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*, 1981. **88**(7): p. 583-600.
100. Lavinsky, D., et al., *Randomized clinical trial evaluating mETDRS versus normal or high-density micropulse photocoagulation for diabetic macular edema.* *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(7): p. 4314-23.
101. Mitchell, P., T.Y. Wong, and G. Diabetic Macular Edema Treatment Guideline Working, *Management paradigms for diabetic macular edema.* *Am J Ophthalmol*, 2014. **157**(3): p. 505-13 e1-8.
102. Browning, D.J., et al., *Diabetic macular edema: what is focal and what is diffuse?* *Am J Ophthalmol*, 2008. **146**(5): p. 649-55, 655.e1-6.
103. Lang, G.E., *Diabetic macular edema.* *Ophthalmologica*, 2012. **227 Suppl 1**: p. 21-9.
104. Paneni, F., et al., *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I.* *Eur Heart J*, 2013. **34**(31): p. 2436-43.
105. Do, D.V., et al., *Ranibizumab for edema of the macula in diabetes study: 3-year outcomes and the need for prolonged frequent treatment.* *JAMA Ophthalmol*, 2013. **131**(2): p. 139-45.

106. Nepomuceno, A.B., et al., *A Prospective Randomized Trial of Intravitreal Bevacizumab Versus Ranibizumab for the Management of Diabetic Macular Edema*. Am J Ophthalmol, 2013.
107. Mitchell, P., et al., *The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2011. **118**(4): p. 615-25.
108. Elman, M.J., et al., *Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2011. **118**(4): p. 609-14.
109. Diabetic Retinopathy Clinical Research, N., et al., *Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema*. N Engl J Med, 2015. **372**(13): p. 1193-203.
110. Brown, D.M., et al., *Intravitreal Aflibercept for Diabetic Macular Edema: 100-Week Results From the VISTA and VIVID Studies*. Ophthalmology, 2015. **122**(10): p. 2044-52.
111. Chong, V., *Biological, preclinical and clinical characteristics of inhibitors of vascular endothelial growth factors*. Ophthalmologica, 2012. **227 Suppl 1**: p. 2-10.
112. Olsen, T.W., *Anti-VEGF Pharmacotherapy as an Alternative to Panretinal Laser Photocoagulation for Proliferative Diabetic Retinopathy*. JAMA, 2015. **314**(20): p. 2135-6.
113. Saint-Geniez, M., et al., *Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3554.