



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Oftalmologia

Biomarcadores no Edema Macular Diabético

Guilherme de Carvalho Sanches de Miranda

Maio'2017



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Oftalmologia

Biomarcadores no edema macular diabético

Guilherme de Carvalho Sanches de Miranda

Orientado por:

Prof. Dr. Carlos Marques Neves

Maio'2017

Resumo

A terapêutica com agentes anti-fator de crescimento vascular endotelial (anti-VEGF) é considerada *gold standard* no tratamento do edema macular em doentes diabéticos. A eficácia do tratamento é variável entre doentes, sendo que um número considerável não apresenta uma resposta satisfatória. Nestes doentes, poderá existir uma predominância de outras vias patogénicas para além da via do VEGF ou lesões não reversíveis. A concentração de fatores inflamatórios e angiogénicos nos doentes com edema macular diabético poderia ajudar a prever a eficácia do tratamento e estabelecer o prognóstico de cada doente.

Foram selecionados estudos prospectivos que mediram as concentrações de fatores inflamatórios e angiogénicos nos humores vítreo e aquoso de doentes com edema macular diabético.

Os doentes com concentrações mais elevadas de VEGF, fator de crescimento placentário (PlGF), recetor solúvel do fator de crescimento vascular endotelial (sVEGFR)-1, *Monocyte-chemotactic Protein* (MCP)-1, molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, Interleucina (IL)-6 e *Interferon γ -Induced Product* (IP)-10 apresentam uma melhor resposta à terapêutica anti-VEGF. Concentrações pouco elevadas de fatores inflamatórios e angiogénicos em doentes traduzem uma pior resposta ao tratamento e poderão ser prova da presença de lesões irreversíveis. A avaliação da concentração destas citocinas pode ajudar a prever a eficácia da terapêutica anti-VEGF.

Palavras-chave

Retinopatia diabética, edema macular diabético, barreira hematorretiniana, fator de crescimento vascular endotelial, citocinas, inflamação

Abstract

Therapy with anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) agents is considered gold standard in the treatment of macular edema in diabetic patients. The efficacy of treatment varies among patients, and a considerable number does not present a satisfactory response to treatment. In these patients, other pathogenic pathways beyond the VEGF pathway may prevail or non-reversible lesions may be present. The concentration of inflammatory and angiogenic factors in patients with diabetic macular edema could help predict the efficacy of treatment and establish the prognosis of each patient.

Prospective clinical studies that measured concentrations of inflammatory and angiogenic factors in the vitreous and aqueous humor of patients with diabetic macular edema were selected.

Patients with higher concentrations of VEGF, Placental growth factor (PlGF), soluble vascular endothelial growth factor (sVEGFR)-1, Monocyte-chemotactic Protein (MCP)-1, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, interleucine (IL)-6 and Interferon γ - Induced Product (IP)-10 have better response to anti-VEGF therapy. Low concentrations of inflammatory and angiogenic factors in patients who do not have a good response to treatment may be an evidence of non-reversible lesions. Evaluation of these markers could help predict the efficacy of anti-VEGF treatment.

Keywords

Diabetic retinopathy, diabetic macular edema, blood-retinal barrier, vascular endothelial growth factor, cytokines, inflammation

Índice

Lista de abreviaturas	ii
Lista de figuras	iii
Lista de gráficos	iii
Lista de quadros	iv
Introdução	1
Fisiopatologia do edema macular diabético	2
Descrição clínica e classificação do edema macular diabético	5
Tratamento do edema macular diabético	8
- Tratamento sistémico	8
- Tratamento local	8
Avaliação da concentração de citocinas no edema macular diabético	11
Discussão	25
- Fatores inflamatórios e angiogénicos e resposta ao tratamento	31
Conclusão	33
Bibliografia	35

Lista de abreviaturas

AGE – Produtos Avançados de Glicação

CX3CL1 – Fractalkina

DRCR.net – *Diabetic Retinopathy Clinical Research Network*

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

ETDRS – *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*

FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos

FLT3 – *Fms-related Tyrosine Kinase 3*

GRO-1 – *Growth-regulated Oncogene 1*

GM-CSF – *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*

HGF – Fator de Crescimento de Humano

ICAM – Molécula de Adesão Intercelular

IL – Interleucina

IP – *Interferon γ - Induced Product*

MCP – *Monocyte-chemotactic Protein*

MDC – Quimiocina Derivada de Macrófagos

MIG – Monocina induzida pelo Interferão γ

MIP – Proteína Inflamatória de Macrófago

MMIF – Fator Inibitório da Migração de Macrófagos

MMP – Metaloproteínase de Matriz

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

OCT – Tomografia de Coerência Ótica

PAI – Inibidor do Ativador do Plasminogénio

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PEDF – Fator Derivado do Epitélio Pigmentado

PIGF – Fator de Crescimento Placentário

PKC – Proteína-quinase C

PPAR – *Peroxisome proliferator-activated receptor*

SAVE – *Subretinal Fluid, Area, Vitreoretinal Interface Abnormalities and Aetiology*

SDF – Fator Derivado das Células do Estroma

sVEGFR – Recetor Solúvel do Fator de Crescimento Vascular Endotelial

TGF – Fator de Crescimento Tecidual

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRAIL – *Tumor necrosis factor α -related apoptosis inducing ligand*

VCAM – *Vascular Cell Adhesion Molecule*

VCR – Veia Central da Retina

VE – Vascular Endotelial

VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial

Lista de figuras

Figura 1 – Representação esquemática da barreira hematorretiana e vascularização da retina (Kuno *et al.*)

Lista de gráficos

Gráfico 1 – Diferentes vias fisiopatológicas envolvidas no desenvolvimento do edema macular diabético (Romero-Aroca *et al.*)

Lista de quadros

Quadro 1 – Classificação do edema macular diabético pela escala *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*

Quadro 2 – Classificação do edema macular pela escala SAVE

Quadro 3 – Classificação do edema macular diabético pela escala *International Clinical Diabetic Retinopathy Severity*

Quadro 4 – Concentração de VEGF e IL-6 no humor vítreo em doentes com edema macular diabético e no grupo de controlo em Funatsu *et al.* 2003

Quadro 5 – Concentração de VEGF e IL-6 no humor vítreo em doentes com edema macular diabético, edema macular por oclusão de ramo da veia central da retina e edema macular por oclusão da veia central da retina em Funatsu *et al.* 2012

Quadro 6 – Concentração de marcadores no humor vítreo de doentes com edema macular diabético, doentes diabéticos sem retinopatia e doentes sem diabetes em Funatsu *et al.* 2009

Quadro 7 – Concentração de marcadores no humor vítreo de doentes com edema macular diabético hiperfluorescente e hipofluorescente em angiografia com fluoresceína Funatsu *et al.* 2009

Quadro 8 - Concentração de marcadores nos três tipos morfológicos de edema macular diabético e no grupo de controlo em Sonoda *et al.* 2014

Quadro 9 – Concentração de marcadores aumentados no humor aquoso de doentes com edema macular diabético e no grupo de controlo em Jonas *et al.* 2012

Quadro 10 – Concentração de marcadores no humor aquoso de doentes com edema macular diabético não tratado, com recorrência após bevacizumab e grupo de controlo em Roh *et al.* 2009

Quadro 11 - Concentração de fatores detetados no humor vítreo de doentes com edema macular diabético e grupo de controlo em Funk *et al.* 2010

Quadro 12 – Concentração de fatores no humor aquoso em doentes com edema macular diabético, previamente ao tratamento, e no grupo de controlo em Sohn *et al.* 2011

Quadro 13 – Concentração de fatores no humor aquoso em doentes com edema macular diabético, 1 mês após injeção intravítrea com triamcinolona ou bevacizumab em Sohn *et al.* 2011

Quadro 14 – Principais fatores alterados no edema macular diabético e suas características mais relevantes

Introdução

Prevê-se que a prevalência de diabetes *mellitus* a nível mundial venha a ser de 4,4% em 2030 e que o número total de indivíduos com diabetes *mellitus* aumente de 171 milhões, em 2000, para 366 milhões em 2030.^{1,2} A retinopatia diabética é uma das principais causas de cegueira entre a população adulta nos países desenvolvidos. Apesar de poder ocorrer uma diminuição grave da acuidade visual devido à retinopatia diabética proliferativa, a principal causa de perda de visão nestes doentes é o edema macular.³

As alterações microvasculares e estruturais na retina que definem o edema macular diabético são bem conhecidas, nomeadamente a disrupção da barreira hematorretiniana, perda de junções de oclusão entre as células do endotélio e aumento da espessura da membrana basal que levam à desregulação e oclusão do leito capilar com extravasão de conteúdo para a mácula.

As alterações subjacentes, ao nível da sinalização celular, que caracterizam a doença são complexas. Pensa-se que uma combinação de inflamação, isquemia e *stress* oxidativo leve à libertação de fatores inflamatórios e angiogénicos, e as mais recentes terapêuticas farmacológicas centram-se na modulação destas vias. Concentrações elevadas do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) desempenham um papel central na patogénese da doença, e atualmente a terapêutica anti-VEGF é considerada *gold standard* na abordagem ao edema macular diabético.

A eficácia destes fármacos no tratamento do edema macular diabético foi comprovada em diversos estudos, no entanto a resposta ao tratamento pode variar significativamente entre indivíduos ⁴ e cerca de 30% dos doentes não responde ao mesmo.⁵ Supõe-se que a predominância de diferentes mecanismos da doença possa justificar a resposta ao tratamento. O conhecimento antecipado, ou numa fase inicial, das vias fisiopatogénicas dominantes permitiria otimizar a atuação clínica e definir melhor o prognóstico de cada doente.

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão sobre a informação existente acerca dos fatores angiogénicos e inflamatórios presentes no edema macular diabético e perceber se é possível avaliar a resposta ao tratamento e o prognóstico global da doença com base nesses marcadores.

Fisiopatologia do edema macular diabético

A principal causa de edema macular diabético é a disrupção da barreira hematorretiniana. A barreira hematorretiniana regula a passagem de substâncias ou microorganismos, reduzindo assim o risco de inflamação da retina. Funcionalmente, a barreira pode ser dividida em dois componentes:

- a) Epitélio pigmentado da retina, que atua como barreira hematorretiniana externa;
- b) Plexos vasculares da retina, que atuam como barreira hematorretiniana interna.

As células do epitélio pigmentado da retina estão unidas por junções de oclusão, formando uma barreira física à difusão de componentes extracelulares. O fluxo entre os capilares e a retina neurosensorial exige que o percurso seja feito intracelularmente. Estas células também produzem VEGF, uma citocina pro-angiogénica e que aumenta a permeabilidade vascular e fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) que exerce o efeito oposto.⁶

Os capilares da artéria central da retina formam dois plexos vasculares, cujas células também se encontram fortemente unidas por junções de adesão e de oclusão. O transporte de moléculas para o meio extracelular pode ser feito de forma paracelular (entre as uniões endoteliais) ou pelo meio intracelular. Existem ainda diversas células estruturais associada, como pericitos, células da glia (como os astrócitos e células de Müller), que também exercem função de barreira.⁶

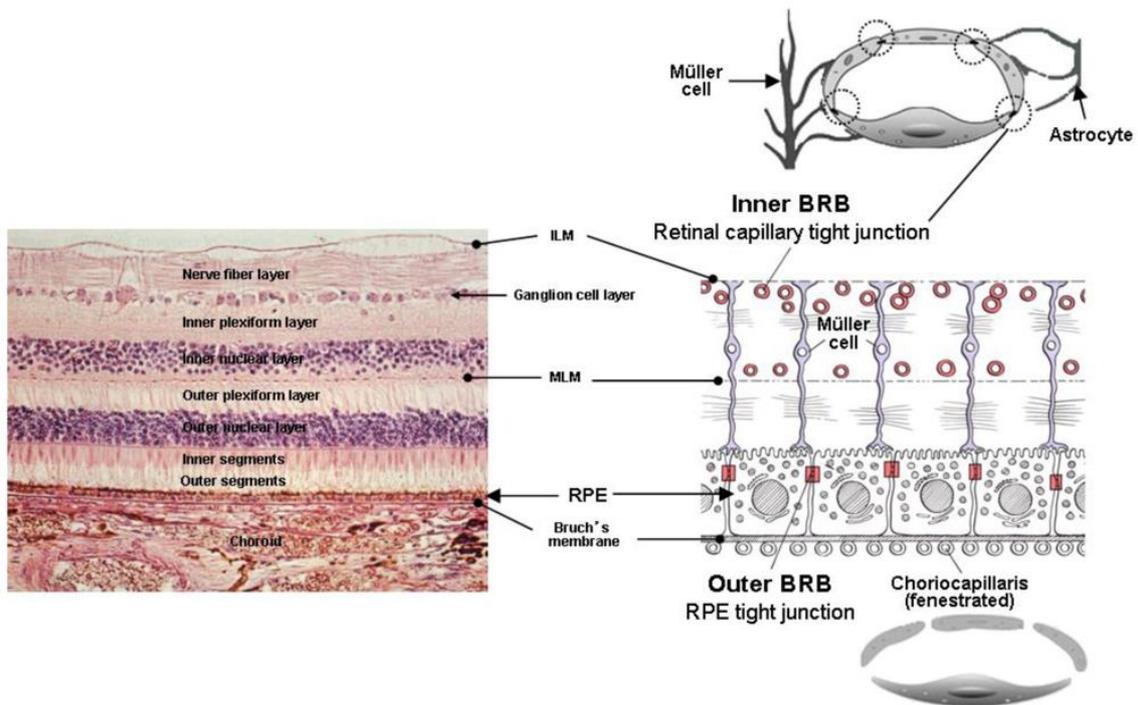


Figura 1 – Representação esquemática da barreira hematorretiniana e vascularização da retina⁷

Na diabetes, considera-se que a hiperglicemia é a principal responsável pela cascata de alterações que lesam a barreira hematorretiniana. A concentração elevada de glicose ativa diversas vias metabólicas que culminam na lesão da barreira hematorretiniana:

- a) Via do poliol: o excesso de glucose é convertido em sorbitol pela aldose-reductase, permanecendo dentro da célula e causando dano celular. Em paralelo, a sobreexpressão da aldose-reductase induz uma *downregulation* da glutathione, um antioxidante, levando a um aumento do *stress* oxidativo. O *stress* oxidativo é agravado pelo facto de tanto o sorbitol como a aldose-reductase serem produzidos na mitocôndria.
- b) A formação de produtos avançados de glicação (AGE) altera a conformação das proteínas de membrana na barreira endotelial e despoleta a cascata inflamatória. Os AGE's são o resultado da ligação não-enzimática de glicose às proteínas das membranas celulares. O dano celular acontece quando estes se ligam a recetores específicos (RAGE) e induzem a cascata inflamatória. O *stress* oxidativo aumenta a expressão desses recetores, aumentando e perpetuando a lesão celular.

- c) A ativação de proteína-quinase C (PKC) é uma via importante na ruptura da barreira endotelial. O *stress* oxidativo aumenta a atividade da PKC, que atua regulando a resposta imunitária, crescimento celular e desenvolvimento da membrana celular, que culmina na angiogênese. Outros eventos, induzidos diretamente pela PKC, ou outros fatores por si induzidos como o VEGF ou o fator de crescimento tecidual (TGF) β , incluem a deposição de matriz extracelular, a fibrinólise e resposta inflamatória.
- d) O *stress* oxidativo, secundário à acumulação de radicais livres sob a forma de espécies reativas de oxigênio, está associado a diversas formas de lesão celular e a perda de células endoteliais e pericitos. A via do poliol diminui a ação antioxidante da glutatona. As espécies reativas de oxigênio aumentam a atividade de PKC. A interação das diferentes vias de atuação das espécies reativas de oxigênio tem um papel central no desenvolvimento da retinopatia diabética, difícil de controlar, dada a sua redundância.

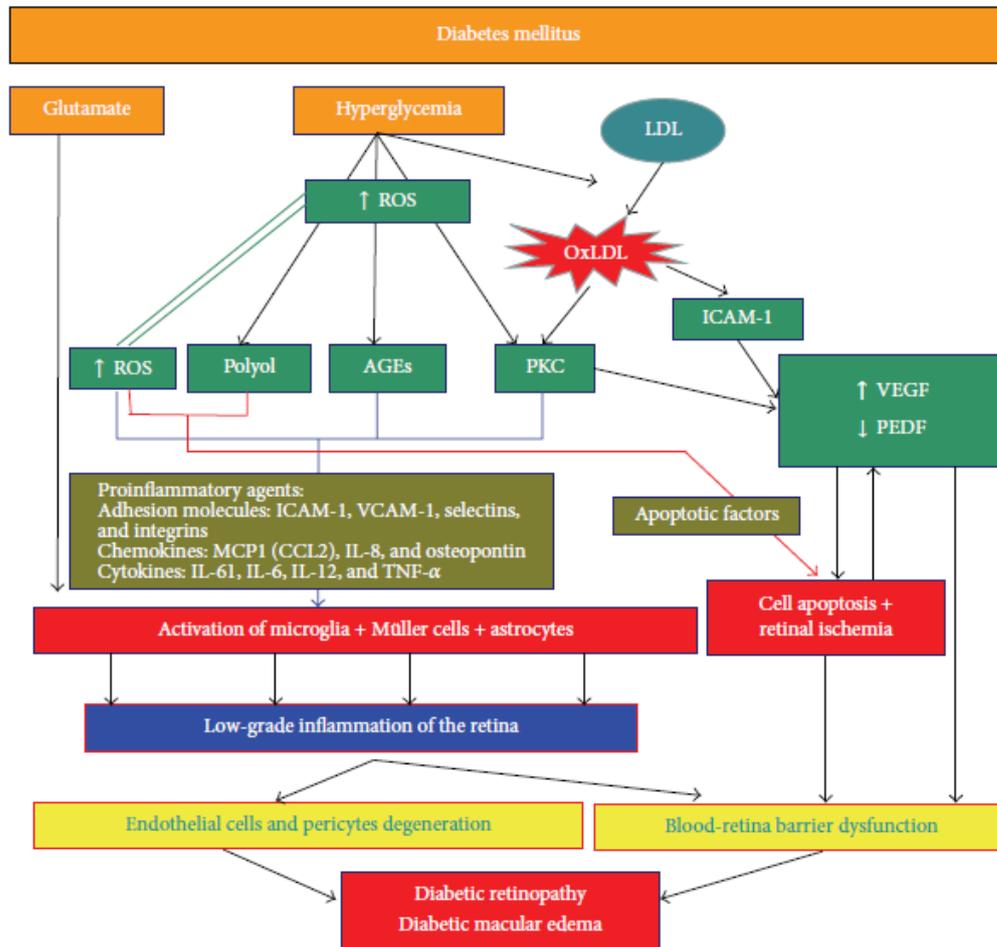
As diversas vias descritas culminam num estado de hiperpermeabilidade e extravasamento vascular.⁶

O VEGF lesa a barreira hematorretiniana via fosforilação da ocludina, através da proteína-quinase C, que induz o desarranjo das junções de oclusão através de um processo de endocitose.⁸ A proteína-quinase C é também responsável pela fosforilação e perda de função da proteína das junções aderentes caderina vascular endotelial (VE-caderina) e pela produção e secreção de óxido nítrico.^{8,9}

Concentrações aumentadas de citocinas pro-inflamatórias e outros mediadores de inflamação – como *monocyte-chemotactic protein-1* (MCP-1), o fator derivado das células do estroma (SDF-1) e as moléculas de adesão *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) e *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), condicionam inflamação crônica na retina diabética que leva a ativação de leucócitos, leucostase e alterações na função da barreira hematorretiniana. Monócitos ativados no espaço extravascular, diferenciam-se em macrófagos que secretam citocinas e fatores de crescimento como VEGF, angiopoetina-2, fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucinas e quimiocinas, todos contribuindo para o extravasamento vascular.¹⁰

Recentemente, compreendeu-se que a neurodegeneração também desempenha um papel importante na ruptura da barreira hematorretiniana. As células da glia têm capacidade de regular a resposta hemodinâmica neurovascular e uma disfunção das células da glia contribui para a extravasão vascular na retina diabética.^{11,12}

Gráfico 1 – Diferentes vias fisiopatológicas envolvidas no desenvolvimento do edema macular diabético¹³



Descrição clínica e classificação do edema macular diabético

O edema macular diabético é definido pelo espessamento da retina na região da mácula. A classificação do edema macular pelo *The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) tem sido usada de forma consistente na maioria dos estudos relacionados com a diabetes (quadro 1), mas outras classificações são também difundidas e utilizadas na prática clínica para caracterizar a gravidade da doença e definir as *guidelines* terapêuticas (quadros 2 e 3).

Quadro 1 – Classificação do edema macular diabético pela escala *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*¹⁴

Edema macular diabético	Qualquer espessamento da retina ou exsudados duros no polo posterior
Edema macular diabético clinicamente significativo	a) Espessamento da retina ou exsudados duros a pelo menos 500µm, do centro da mácula, com espessamento da retina adjacente ou, b) Zonas de espessamento da retina com pelo menos o diâmetro de um disco, à distância máxima de um disco do centro da mácula.

Quadro 2 – Classificação do edema macular pela escala *SAVE*¹⁶

Fluido subretiniano	A presença de fluido subretiniano é avaliada por OCT e classificada com 0 se ausente e 1 se presente. São contados os campos na grelha ETDRS que apresentam espessamento (0–9 campos)
Área	São contados os campos na grelha ETDRS que apresentam espessamento (0-9 campos)
Anormalidades da interface Vitreo retiniana	A presença de anormalidades na interface vítreoretiniana é avaliada por OCT e classificada como 0, se for normal, ou 1 na presença de membrana epirretiniana, tração vítreoretiniana ou de buraco macular
Etiologia	
Tipo 1	Extravasão vascular focal ou multifocal, avaliada por angiografia fluoresceínica, que cause edema exsudativo
Tipo 2	Extravasão vascular não focal, que cause edema exsudativo sem origem definida
Tipo 3	Isquemia macular, definida pela ausência de perfusão capilar e classificada numa imagem de campo alargado aos 3 ou 5 minutos.
Tipo 4	Edema atrófico: degeneração retiniana cística com ausência de células de Müller

ETDRS – *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*; OCT- Tomografia de Coerência Ótica; *SAVE* – *Subretinal Fluid, Area, Vitreoretinal Interface Anormalities and aetiology*

Quadro 3 – Classificação do edema macular diabético pela escala *International Clinical Diabetic Retinopathy Severity*¹⁵

Edema macular diabético ligeiro	Espessamento da retina ou exsudados duros no polo posterior, mas afastados do centro da mácula
Edema macular diabético moderado	Espessamento da retina ou exsudados duros perto do centro da mácula
Edema macular diabético grave	Espessamento da retina ou exsudados duros envolvendo o centro da mácula

O edema macular diabético tende a ser uma doença crónica, apesar de existirem casos em que se observa uma remissão espontânea. Em cerca de 24% dos olhos com edema macular clinicamente significativo e 33% dos olhos com edema macular clinicamente significativo com envolvimento central, há uma diminuição da acuidade visual em pelo menos 15 letras da tabela ETDRS, após três anos sem tratamento.¹⁷ A incidência da doença aumenta significativamente com o aumento da gravidade da diabetes, independentemente da idade de diagnóstico.¹⁸

Podemos falar de doença focalizada ou difusa. O edema macular focal deve-se à extravasão vascular de microaneurismas localizados. Estes microaneurismas são frequentemente rodeados por exsudados duros, depósitos de lipoproteínas.¹⁹ No edema macular difuso existem áreas difusas de extravasão vascular, normalmente devido a dilatação dos capilares retinianos ou anormalidades microvasculares.²⁰ Podem existir alterações císticas associadas (edema macular cístico), que resulta de uma disrupção generalizada da barreira hematorretiniana interna, com acumulação de fluido.²¹

Tratamento do edema macular diabético

Tratamento sistémico

Diversos estudos aleatorizados demonstraram os benefícios da terapêutica sistémica no tratamento da retinopatia diabética.

Comprovou-se que o controlo metabólico do sistema renina-angiotensina reduz a incidência e o risco de progressão da retinopatia diabética em pessoas com diabetes *mellitus*.^{22,23}

O fenofibrato, agonista do PPAR- α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*), demonstrou ser capaz de reduzir o risco de progressão de retinopatia diabética até 40% entre doentes com retinopatia diabética não proliferativa. Este efeito pode estar associado à redução da dislipidemia²⁴, mas o principal mecanismo de ação poderá dever-se à inibição da produção do factor de crescimento placentário (PIGF), uma citocina pro-angiogénica da superfamília VEGF.²⁵

O controlo da glicemia também demonstrou ter um efeito positivo, essencialmente numa fase precoce.²⁶

Tratamento Local

Apesar dos efeitos benéficos da abordagem sistémica, a melhor eficácia no tratamento do edema macular diabético é alcançada através do tratamento local.

Terapêutica anti-VEGF

Os fármacos anti-VEGF alteraram o paradigma do tratamento do edema macular diabético, com diversos estudos a demonstrarem resultados superiores à terapia laser.

Existem 3 fármacos anti-VEGF utilizados, com eficácia clínica comprovada: bevacizumab, ranibizumab e aflibercept. O grupo de trabalho *The Diabetic Retinopathy Clinical Research Network (DRCR.net)* reportou que, ao fim de 1 ano de tratamento, o aflibercept demonstrou um maior ganho de visão comparativamente aos outros dois fármacos, especialmente nos doentes com uma acuidade visual mais degradada.⁵ Ao fim

de dois anos de seguimento, todos os 3 fármacos estiveram associados a uma melhoria na acuidade visual e a uma diminuição da frequência de injeções necessárias para manter esse ganho de visão. Entre os doentes com menor acuidade visual, a eficácia do aflibercept manteve-se superior ao bevacizumab mas não ao ranibizumab.²⁷

Apesar de a terapêutica anti-VEGF ser mais eficaz que a terapia laser no tratamento do edema macular diabético, até 50% dos doentes não apresentam uma boa resposta aos tratamentos²⁸ e cerca de 30% não respondem ao tratamento²⁹. O edema macular diabético é uma doença complexa em que a via do VEGF é somente um dos mecanismos de doença. Postula-se, que em determinados doentes, os principais mecanismos fisiopatológicos ativos serão os associados a inflamação ou à neurodegeneração em que fármacos alternativos teriam um melhor efeito terapêutico. Ainda assim, não podemos deixar de assumir que a ausência de resposta à terapêutica também se poderá dever a um dano irreversível nos fotorreceptores existentes.

A terapêutica anti-VEGF administrada intraocularmente é considerada segura e as complicações oculares são raras.³⁰

Terapia laser

Previamente ao desenvolvimento e aceitação do tratamento com agentes anti-VEGF, a terapia a laser focal ou em grelha era considerada o tratamento *gold standard*, diminuindo o risco de perda moderada de visão.³⁰ A terapia a laser pode encerrar vasos exsudativos e favorecer a reparação endotelial, diminuindo a extravasão de fluido através da barreira hematorretiniana lesionada³¹ e até estimular uma certa reabsorção.^{32,33}

A terapia com laser ainda desempenha um papel importante nos casos que não envolvem o centro da fóvea mas são classificados como edema macular clinicamente significativo com base nos critérios ETDRS.¹⁷

A maioria dos estudos que avaliaram a eficácia da terapêutica anti-VEGF no tratamento do edema macular diabético com envolvimento do centro da fóvea incorporam a terapia laser como uma alternativa ou como tratamento combinado. O tratamento com laser em zonas de isquemia da retina poderá ter um efeito na redução de produção de VEGF. Foi demonstrado que injeções de bevacizumab combinadas com tratamento laser dirigido a áreas não perfundidas da retina obtiveram um melhor resultado na melhoria da acuidade visual que doentes em monoterapia com bevacizumab.⁴

Corticosteroides

A terapêutica com corticosteroides tem o objetivo de reduzir a inflamação no edema macular diabético.³⁴ Apesar de injeções intraoculares de triamcinolona comprovadamente reduzirem o edema macular e melhorarem a acuidade visual no curto prazo, estão associadas a uma elevada taxa de cirurgias às cataratas e pressão intraocular elevada. No entanto, doses mais baixas terão potencialmente efeitos terapêuticos semelhantes, com taxas inferiores de complicações.³⁵

Foram desenvolvidos diversos implantes de libertação prolongada com o objetivo de reduzir os efeitos secundários e obter um efeito contínuo.³⁶

Apesar de a terapêutica anti-VEGF apresentar uma taxa de segurança superior, o tratamento com corticosteroides pode ser uma arma no tratamento de doentes que não reajam de forma satisfatória à terapêutica anti-VEGF ou de forma adjuvante para reduzir a frequência de tratamento em doentes com edema macular crónico persistente ou recorrente, particularmente em doentes já submetidos a cirurgia de cataratas (pseudofáquicos).³⁷

Cirurgia

A evidência de que anormalidades na interface vitreomacular podem ter um efeito na fisiopatologia do edema macular diabético fez surgir a teoria que a cirurgia de remoção do vítreo poderia ter um efeito positivo na doença, ao reduzir a tração macular e ao melhorar a oxigenação na cavidade vítrea.³⁸ Os estudos realizados revelaram, no entanto, resultados variáveis.³⁹

Avaliação da concentração de citocinas no edema macular diabético

Por não ser eticamente aceitável realizar biópsias de retina em doentes, o estudo dos fatores angiogénicos e pro-inflamatórios envolvidos na progressão da retinopatia diabética e do edema macular em humanos é, essencialmente, feito de forma indireta, através da análise qualitativa e quantitativa dessas proteínas no humor vítreo ou no humor aquoso.

Permanecem algumas dúvidas acerca do grau de fidedignidade dessas análises para estabelecer um diagnóstico. Um dos fatores a ter em conta aquando da interpretação de fatores angiogénicos ou inflamatórios no humor vítreo ou aquoso é a origem das proteínas. O extravasamento vascular aumentado, característico da doença, condiciona a existência de níveis aumentados de proteínas,⁴⁰ não sendo seguro assumir que a concentração dessas proteínas reflete a sua expressão na retina. Apesar de existirem métodos para estimar a contribuição de proteínas plasmáticas, muitos dos estudos disponíveis não fornecem dados, ou não testam a presença de proteínas plasmáticas ou hemoglobina nas amostras.⁴¹ Uma concentração superior aos níveis séricos é a única garantia de que as concentrações medidas se devem a uma expressão intraocular aumentada.⁴²

A colheita de amostras de humor aquoso e humor vítreo também não é um procedimento inócuo, havendo dificuldade em conseguir séries com muitos doentes e ainda maior dificuldade em conseguir amostras de controlo. Os grupos de controlo são, habitualmente, compostos por doentes com outras patologias oculares não diabéticas e não por indivíduos saudáveis, o que limita a interpretação.

Métodos

Foi feita uma pesquisa *online* nas plataformas PubMed e B-On. Os termos de pesquisa incluíram *diabetic retinopathy*, *diabetic macular edema*, *inflammatory factor*, *VEGF*, *cytokines*. Foram selecionados artigos originais, que expressassem a concentração de citocinas em doentes com edema macular diabético, privilegiando estudos com resultados comparativos entre diferentes grupos/ grupo de controlo. As citações desses artigos foram também utilizadas para identificar outros estudos.

a) ***“Vitreous Levels of Interleukin-6 and Vascular Endothelial Growth Factor Are Related to Diabetic Macular Edema”***⁴³

Este estudo pretendia avaliar as concentrações de Interleucina-6 (IL-6) e VEGF no humor vítreo de doentes com edema macular diabético.

Foram colhidas amostras de humor vítreo de 26 doentes com edema macular diabético e de 12 indivíduos com doença ocular não diabética. Entre os doentes com edema macular diabético, 20 tinham edema macular difuso e 6 edema macular cístico. Entre os doentes com doença não diabética, 9 tinham buraco macular e 3 membrana epirretiniana, sem vitreorretinopatia proliferativa associada. Foram igualmente colhidas amostras de plasma dos 26 doentes com edema macular diabético.

As amostras foram analisadas através de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), sendo detetadas concentrações substancialmente elevadas de IL-6 e VEGF em relação ao grupo de controlo. As concentrações de IL-6 e VEGF detetadas na amostra do vítreo foram superiores às registadas no plasma em todos os doentes com edema macular diabético.

Quadro 4 – Concentração de VEGF e IL-6 no humor vítreo em doentes com edema macular diabético e no grupo de controlo

	Ed. Mac. Diabético	Grupo de controlo
VEGF (pg/ml)*	818 pg/ml (36.8-1902.4)	17.8pg/ml (15.6–26.2)
IL-6 (pg/ml)*	188.1 pg/ml (18.0–768.4)	9.51 pg/ml (4.02–22.4)

Assinaladas com * as concentrações com valor p estatisticamente significativo. Entre () valores mínimo e máximo medidos

Concentrações mais elevadas de IL-6 e VEGF estavam associadas a edema macular diabético hiperfluorescente e a maior gravidade da retinopatia diabética [VEGF: 1008.6 pg/ml (52.8–1902.4); IL-6: 228.6 pg/ml (18.0–768.4)].

Não houve, contudo, uma diferença significativa entre as amostras dos doentes com edema macular difuso e edema macular cístico.

b) “Vitreous inflammatory factors and macular oedema”⁴⁴

Este estudo tinha como objetivo comparar as concentrações de VEGF e IL-6 em doentes com edema macular de origem diabético, por oclusão da veia central da retina e por oclusão de ramo da veia central da retina.

Foram estudadas as concentrações no humor vítreo de 36 doentes com edema macular diabético clinicamente significativo, 25 doentes com oclusão de ramo da veia central da retina e 27 doentes com oclusão da veia central da retina. Foram excluídos doentes com injeção prévia de agentes anti-VEGF ou corticosteroides nos 6 meses anteriores, fotocoagulação laser nos 3 meses anteriores ou hemorragia do vítreo. Foram também colhidas amostras de plasma.

As amostras foram analisadas através do método ELISA.

Quadro 5 – Concentração de VEGF e IL-6 no humor vítreo em doentes com edema macular diabético, edema macular por oclusão de ramo da veia central da retina e edema macular por oclusão da veia central da retina

	Ed. M. Diabético	Ed. M. por oclusão de ramo da VCR	Ed. M. por oclusão VCR
VEGF (pg/ml)	1080.1 pg/ml (15.6 - 3042.0)	1263.0 pg/ml (15.6 - 4710.0)	1618.0 pg/ml (15.6 - 9040.0)
IL-6 (pg/ml)*	389.1 pg/ml (21.0 - 918.0)	41.3 pg/ml (0.945 - 192.0)	94.1 pg/ml (6.01 - 383.0)]

Assinaladas com* as concentrações com valor p estatisticamente significafivo. Entre () valores mínimo e máximo medidos. VCR – Veia Central da Retina

As concentrações de VEGF detetadas nas várias amostras do vítreo não diferiam signitivamente entre os doentes com edema macular diabético, oclusão de ramo de veia central da retina ou oclusão central da retina. As concentrações de IL-6 foram substancialmente superiores nos doentes com edema macular diabético em relação aos doentes com oclusão de ramo de veia central da retina e oclusão da veia central da retina. As concentrações no vítreo de VEGF e IL-6 estavam associadas de modo independente à gravidade do edema macular diabético ($p < 0.0001$ e $p = 0.0282$, respetivamente), assim como à gravidade do edema macular relacionado com as outras patologias em estudo.

Os níveis plasmáticos de VEGF e IL-6 não demonstraram uma associação com a gravidade do edema macular.

c) “*Association of Vitreous Inflammatory Factors with Diabetic Macular Edema*”⁴⁵

Foram avaliadas as concentrações de VEGF, ICAM-1, IL-6, *monocyte-chemotactic protein-1* (MCP-1) e fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) no humor vítreo em 53 doentes com edema macular diabético, 8 doentes diabéticos sem retinopatia e 15 doentes com doença ocular não diabética. Entre os doentes com edema macular diabético, 22 tinham edema macular difuso e 31 edema macular cístico.

As concentrações de VEGF, ICAM 1, IL-6 e MCP 1 foram medidas através do método ELISA e as concentrações de PEDF através de *sandwich* ELISA.

Os resultados mostraram que as concentrações no humor vítreo de VEGF, ICAM 1, IL-6 e MCP 1 em doentes com edema macular diabético eram superiores aos doentes sem retinopatia e aos doentes sem diabetes.

A concentração de PEDF nos doentes com edema macular diabético era significativamente inferior à do grupo sem edema.

Quadro 6 – Concentração de marcadores no humor vítreo de doentes com edema macular diabético, doentes diabéticos sem retinopatia e doentes sem diabetes

	Edema macular	S/ retinopatia	S/ diabetes
VEGF (pg/ml)*	1086,4 (15.6-3450.0)	20.4 (15.6-69.6)	35.6 (15.6-86.4)
ICAM-1 (ng/ml)*	18.6 (5.84-52.6)	6.44 (5.00-16.2)	8.42 (5.00-18.4)
IL-6 (pg/ml)*	192.4 (18.0-823.4)	8.74 (4.00-23.2)	18.8 (4.00-66.4)
MCP-1 (pg/ml)*	1764.4 (176.4-3298.6)	426.3 (116.4-1128.6)	678. (143.8-1654.2)
PEDF (ng/ml)*	3.20 (1.95-18.8)	23.4 (7.84-56.3)	24.6 (16.6-39.3)

Assinaladas com* as concentrações com valor p estatisticamente significativo. Entre () valores mínimo e máximo medidos

As concentrações de VEGF, ICAM 1, IL-6 e MCP 1 eram significativamente superiores nos doentes com edema macular diabético hiperfluorescente, enquanto a concentração de PEDF era inferior, quando comparadas com doentes com edema macular minimamente fluorescente. As concentrações de VEGF e ICAM 1 foram as que mais se relacionaram com a gravidade do edema macular diabético

Quadro 7 – Concentração de marcadores no humor vítreo de doentes com edema macular diabético hiperfluorescente e hipofluorescente em angiografia com fluoresceína

	Hiperfluorescente	Hipofluorescente
VEGF (pg/ml)*	1712.4 (253.6-3450.0)	533 (15.6-1612.4)
ICAM-1 (ng/ml)*	22.4 (7.10-52.6)	8.96 (5.84-17.6)
IL-6 (pg/ml)*	244.1 (18.0-823.4)	93.2 (18.0-262.4)
MCP-1 (pg/ml)*	2116.8 (352.6-3298.6)	1264.6 (176.4-2032.4)
PEDF (ng/ml)*	2.47 (1.95-8.31)	4.73 (1.95-19.2)

Assinaladas com* as concentrações com valor p estatisticamente significativo. Entre () valores mínimo e máximo medidos

d) “Retinal morphologic changes and concentrations of cytokines in eyes with diabetic macular edema”⁴⁶

Este estudo avaliou a relação entre VEGF, IL-6 e IL-8 e a morfologia do edema macular diabético avaliada por tomografia de coerência ótica (OCT).

Foram estudadas 52 amostras de humor vítreo de doentes com edema macular clinicamente significativo. Os níveis de VEGF foram medidos usando o método ELISA e os níveis de IL-6 e IL-8 foram medidos usando um kit Multiplex.

Comparando doentes com padrão difuso, cístico e descolamento seroso da retina, verificou-se que as concentrações de IL-6 e IL-8 eram significativamente superiores nos doentes com descolamento seroso da retina, sendo que as concentrações de IL-6 eram as mais fortemente correlacionadas com descolamento seroso da retina.

Os valores de VEGF estavam correlacionados com os de IL-6.

Os doentes com edema macular cístico apresentaram valores de IL-6 e IL-8 inferiores à média.

e) “Comparison of aqueous concentrations of angiogenic and inflammatory cytokines based on optical coherence tomography patterns of diabetic macular edema”⁴⁶

Com o objetivo de comparar as concentrações de IL-6, IL-8, *Interferon γ - Induced Product-10* (IP-10), MCP-1, fator de crescimento derivado de plaquetas-AA (PDGF-AA)

e VEGF em diferentes padrões morfológicos de edema macular diabético, baseado em tomografia de coerência ótica (OCT), foram colhidas amostras de humor aquoso de 50 doentes com edema macular diabético e 12 indivíduos sem doença.

As amostras foram analisadas através do método Multiplex.

Quadro 8 - Concentração de marcadores nos três tipos morfológicos de edema macular diabético e no grupo de controlo

	Grupo de Controlo	Edema macular diabético		
		Difuso	Cístico	Descolamento seroso da retina
IL-6 (pg/ml)*	17.7	39.4	20.9	47.1
IL-8 (pg/ml)*	10.8	21.0	29.5	31.8
IP-10 (pg/ml)*	239.5	390.0	398.0	479.0
MCP-1 (pg/ml)*	1166.1	2495.0	3121.2	4211.8
PDGF-AA (pg/ml)	71.7	68.3	77.7	86.5
VEGF (pg/ml)*	38.4	68.5	79.2	94.4

Assinaladas com* as concentrações com valor p estatisticamente significativo

O grupo de doentes com edema macular diabético apresentou concentrações superiores de IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 e VEGF. Não houve diferença significativa na concentração de PDGF-AA entre o grupo de controlo e o grupo com edema macular diabético.

A concentração de IL-6 foi significativamente inferior nos doentes com edema macular diabético cístico, não havendo diferença entre os outros dois grupos.

A concentração de IL-8 foi significativamente superior nos doentes com edema macular difuso e descolamento seroso da retina, não apresentando diferenças significativas entre si.

A concentração de IP-10 e PDFG-AA foi superior no grupo com descolamento seroso da retina, no entanto esta diferença só teve significância estatística quando comparado com o edema macular difuso.

As concentrações de MCP-1 e VEGF não apresentaram diferenças entre os doentes com diferentes morfologias de edema macular diabético, mas foram substancialmente superiores aos doentes sem doença.

f) “*Cytokine Concentration In Aqueous Humor Of Eyes With Diabetic Macular Edema*”³⁴

Este estudo pretendeu avaliar a relação de um vasto leque de proteínas com o edema macular diabético. Foi estudada a concentração do fator de crescimento tecidual (TGF)- α , TGF- β , fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF- β), fator de crescimento humano (HGF)- β , Interferão (IFN)- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1a2, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IP-10, ICAM 1, *monocyte-chemotactic protein* (MCP)-1, MCP-3, fator inibitório da migração de macrófagos (MMIF), monocina induzida pelo Interferão γ (MIG), metaloproteínase de matriz (MMP)-1, MMP-9, inibidor do ativador do plasminogénio (PAI)-1, PIGF, PDGF, fator derivado das células do estroma (SDF)-1, *tumor necrosis factor α -related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), VCAM e VEGF no humor aquoso de 23 doentes com edema macular diabético difuso e em 22 doentes que iriam realizar cirurgia eletiva a cataratas. O tratamento prévio com laser, bevacizumab ou triamcinolona não foi critério de exclusão, desde que tivessem sido realizados há mais de 9 meses.

As amostras foram analisadas através de kit Multiplex.

Comparativamente ao grupo de controlo, foram medidas concentrações significativamente superiores de EGF, HGF, ICAM-1, IL-3, IL-6, IL-8, IP10, MCP-1, MIG, MMP-9, PAI 1, PIGF, TGF- β , VCAM e VEGF. Em relação às outras citocinas estudadas não foi detetada diferença significativa em relação ao grupo de controlo.

A citocina que mais fortemente se correlacionou com a espessura da mácula foi ICAM 1.

Quadro 9 – Concentração de marcadores aumentados no humor aquoso de doentes com edema macular diabético e no grupo de controlo

(pg/ml)	Edema macular diabético	Grupo de controlo
VEGF*	86.9 (0.00-194.6)	43.1 (0.0-102)
PIGF*	12.2 (0.00-47.5)	1.54 (0.00-10.0)
IL-6*	77.6 (0.00-497)	7.48 (0.00-69.1)
IL-8*	4.41 (0.00-22.4)	0.43 (0.00-1.98)
ICAM-1*	1023 (217-3675)	319 (83-1214)
MCP-1*	358 (78-744)	168 (58-396)
IP-10*	42.7 (0.00-138)	30.9 (7.68-128)
IL-3*	1.52 (0.00-8.40)	0.42 (0.00-4.06)
HGF*	229 (38-1044)	121 (47-187)
EGF*	6.9 (0.70-12.8)	4.02 (0.00-7.9)
PAI-1*	527 (61-2670)	127 (18.7-1193)
TGF- β *	44.8 (10.7-140)	18.4 (6.06-63.9)
MIG*	56.0 (24.3-93.9)	34.8 (7.64-60.9)
MMP-9*	96.4 (0.00-584)	15.9 (0.00-112)
VCAM*	2060 (264-6621)	765 (167-1645)

Assinaladas com* as concentrações com valor p estatisticamente significativo. Entre () valores mínimo e máximo medidos

g) “Effect of Intravitreal Bevacizumab Injection on Aqueous Humor Cytokine Levels in Clinically Significant Macular Edema”⁴⁷

Este estudo analisou o efeito do tratamento com bevacizumab na concentração de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF- α , Interferão- γ , EGF e MCP-1. Para o efeito foram recolhidas amostras de humor aquoso de 17 doentes com edema macular diabético clinicamente significativo, previamente à injeção de bevacizumab, e 11 amostras em pacientes que realizaram cirurgia eletiva às cataratas e analisadas usando biochip.

Não foram excluídos pacientes submetidos a tratamento prévio com bevacizumab, desde que o mesmo tivesse sido realizado mais de 8 semanas antes e apresentassem recorrência do edema, mas foram analisados num subgrupo diferente.

Quadro 10 – Concentração de marcadores no humor aquoso de doentes com edema macular diabético não tratado, com recorrência após bevacizumab e grupo de controlo

(pg/ml)	Grupo de Controlo	Edema Macular Diabético não-tratado	Edema macular recorrente após bevacizumab
IL-2	7.0±8.0	2.4±2.9	2.2±2.4
IL-4	8.0±4.2	6.6±1.1	6.9±0.5
IL-6*	26.4±36.5	167.3±292.4	94.9±70.9
IL-8*	10.7±7.4	134.0±251.6	62.0±110.4
IL-10	0.9±1.0	0.5±0.7	0.8±1.5
VEGF*	97.2±46.0	242.3±11.2	27.1±35.4
IFN- γ	4.9±7.4	3.5±3.2	2.4±2.4
TNF- α	3.1±3.6	6.7±16.7	0.7±0.4
IL-1a	0.7±0.4	1.0±1.0	0.7±0.4
IL-1b	1.0±0.6	0.7±0.8	0.5±0.4
MCP-1*	520.8±184.5	734±136.7	826±114.3
EGF	1.3±1.5	1.8±2.4	0.8±0.9

Assinaladas com* as concentrações com valor p estatisticamente significativo

As concentrações de IL-6, IL-8, MCP-1, e VEGF foram significativamente superiores nos doentes com edema macular diabético, com exceção do grupo previamente submetido a bevacizumab, que apresentou valores infra fisiológicos de VEGF, mesmo tendo recorrência do edema.

Os valores de IL-6, IL-8, MCP-1 não foram afetados pelo tratamento com bevacizumab.

Nos doentes com recorrência após bevacizumab, foi encontrada uma relação inversa entre as concentrações de VEGF e IL-6 e MCP-1.

h) “Angiogenic And Inflammatory Markers In The Intraocular Fluid Of Eyes With Diabetic Macular Edema And Influence Of Therapy With Bevacizumab”⁴⁸

Foi estudada a associação entre a resposta ao tratamento com bevacizumab e os níveis de citocinas.

Foi colhido o humor aquoso de 10 doentes com edema macular diabético do tipo difuso e comparado com o de 10 doentes que iriam realizar uma cirurgia eletiva a cataratas. Foram excluídos doentes que tivessem realizado tratamentos intravítreo com anti-angiogénicos ou corticosteroides há menos de 3 meses.

As concentrações de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1, interferão- γ , MCP-1, TNF- α , EGF, FGF-2, PDGF-AA e VEGF. foram medidas através de Multiplex.

Todos os doentes foram tratados inicialmente com uma injeção de 1.5mg de bevacizumab e reavaliada a necessidade de novo tratamento mensalmente.

Quadro 11 - Concentração de fatores detetados no humor vítreo de doentes com edema macular diabético e grupo de controlo

(pg/ml)	Edema macular diabético	Grupo de Controlo
IL-6	46.47 (12.2-58.43)	15.4 (0.8-20.44)
IL-8*	16.2 (9.35-23.3)	4.06 (1-6.5)
MCP-1*	1513 (753-2275)	512.64 (216.6-759.8)
VEGF	273.3 (76.8-367.9)	57.62 (37.58-85.32)

Assinaladas com* as concentrações com valor p estatisticamente significativo. Entre () valores mínimo e máximo medidos

A concentração de IL-8 e MCP-1 estava significativamente aumentada nos doentes com edema macular diabético. As concentrações de VEGF e IL-6 também estavam aumentadas, mas sem significância estatística. Após a primeira sessão de tratamento, os níveis no humor aquoso de VEGF diminuiram para níveis infra fisiológicos, não se relacionando com a recorrência da doença.

As concentrações medidas no primeiro mês mantiveram-se inalteradas em avaliações subsequentes, independentemente da melhora clínica.

i) “Changes in aqueous concentrations of various cytokines after intravitreal triamcinolone versus bevacizumab for diabetic macular edema”⁴⁹

Foram selecionados 11 pacientes com edema macular diabético bilateral e 6 doentes que iriam realizar cirurgia eletiva de cataratas, sem outra doença ocular. Os doentes com EMD foram tratados com uma injeção intravítrea de 4mg de triamcinolona e de 1.25mg de bevacizumab em cada olho.

Foram colhidas amostras de humor vítreo antes do tratamento e 4 semanas após, e medidas as concentrações de IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, PDGF-AA e VEGF através de Multiplex.

Todas as citocinas avaliadas apresentavam concentrações mais elevadas nos doentes com edema macular diabético comparativamente ao grupo de controlo sem doença, no entanto, somente IL-8, IP-10, MCP-1 e VEGF apresentava valores significativamente superiores.

Quadro 12 – Concentração de fatores no humor aquoso em doentes com edema macular diabético, previamente ao tratamento, e no grupo de controlo

(pg/ml)	Grupo de Controlo	Edema macular diabético	
		triamcinolona IV	bevacizumab IV
IL-6*	11.7 (3.5-54.2)	29.9 (10.1-82.5)	26.7 (13.8-107.0)
IL-8	4.8 (3.0-16.7)	28.2 (6.2-77.5)	23.9 (11.1-39.7)
IP-10*	309 (104-326)	366 (171-1380)	401 (126-1990)
MCP-1*	1060 (712-1940)	3850 (2060-4380)	3770(2660-4490)
PDGF-AA*	71.0 (41.0-85.7)	68.7 (31.4-141.0)	81.0 (14.3-140.0)
VEGF*	32.3 (12.9-69.7)	55.0 (36-262)	61.5 (31.8-200.1)

Assinaladas com* as concentrações com valor p estatisticamente significafivo. Entre () valores mínimo e máximo medidos

Após o tratamento, os valores de IL-6, IP-10, MCP-1, PDGF-AA e VEGF diminuiram no grupo de olhos submetidos a tratamento com Triamcinolona. No grupo de olhos submetido a tratamento com Bevacizumab, somente os níveis de VEGF estavam significativamente diminuídos, apesar de ter sido observado um decréscimo nos valores de IP-10 e MCP-1. Não se observou uma diminuição da concentração de IL-8 em nenhum dos grupos.

Quadro 13 – Concentração de fatores no humor aquoso em doentes com edema macular diabético, 1 mês após injeção intravítrea com triamcinolona ou bevacizumab

(pg/ml)	Edema macular diabético	
	triamcinolona IV	bevacizumab IV
IL-6	13.8 (2.8-36.3)*	24.0 (6.5-147.0)
IL-8	25.3 (12.4-95.8)	23.6 (11-74.2)
IP-10	249 (28.7-717.0)*	433 (268-4570)
MCP-1	1090 (351-4150)*	3840 (1790-4490)
PDGF-AA	37.1 (10.9-69.7)*	72.7 (23.6-117)
VEGF	10.5 (0.1-372)*	0.1 (0.1-28.3)*

(*) Assinaladas com* as concentrações com valor p estatisticamente significativo. Entre () valores mínimo e máximo medidos

Em estudos anteriores foi observado que o tratamento com bevacizumab num olho também afeta o olho contralateral. O mesmo poderá suceder com os corticosteroides. Este efeito parece ser, no entanto, despiciendo.⁵⁰

j) “Aqueous cytokine and growth factor levels indicate response to ranibizumab for diabetic macular oedema”⁵¹

Este estudo envolveu 68 doentes com edema macular difuso, nunca tratados para o edema macular diabético, que receberam uma injeção intravítrea de 0.5mg de ranibizumab. Foram medidas as concentrações de VEGF, PIGF, recetor solúvel do fator de crescimento vascular endotelial (sVEGFR)-1, sVEGFR-2, MCP-1, ICAM-1, PDGF-AA, IL-6, IL-8 e IP-10 através de Multiplex.

Todos os doentes receberam uma injeção inicial de ranibizumab, sendo avaliados mensalmente, e repetida a dose até se verificar uma resposta ao tratamento, durante um período de estudo de 6 meses.

Os doentes que tinham respondido ao tratamento, mas em quem se tinha observado uma recorrência da doença recebiam novo tratamento com ranibizumab.

Em 35% (24/68) dos olhos tratados, uma injeção com ranibizumab foi suficiente para diminuir o edema macular.

Em 17.6% (12/68) dos olhos tratados, 6 meses de tratamento com ranibizumab não levaram a uma remissão da doença.

Não foi observada relação entre a acuidade visual inicial e a resposta ao tratamento.

Não foi observada relação entre a espessura da mácula inicial e a resposta ao tratamento.

A terapêutica com ranibizumab foi mais eficaz nos doentes em que foram medidas concentrações mais elevadas de citocinas pro-angiogénicas, VEGF, PlGF e sVEGFR1 e concentrações mais elevadas de citocinas inflamatórias, MCP-1, ICAM-1, IL-6 e IP-10. Quanto mais baixa a concentração destas citocinas, pior a resposta ao tratamento.

As concentrações de sVEGFR2, assim como de IL-8 ou PDGF-AA não evidenciaram nenhuma relação com a resposta ao tratamento.

1) “Aqueous cytokine levels are associated with reduced macular thickness after intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema”⁵²

Foi estudado o efeito do tratamento com ranibizumab e a relação com as concentrações de 36 citocinas inflamatórias em 12 doentes (13 olhos) com edema macular diabético. As concentrações de eotaxina-1, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), IL-1ra, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , EGF, FGF-2, TGF- α , *fms-related tyrosine kinase 3* (FLT3), fractalkina (CX3CL1), IFN- α 2, INF- γ , *growth-regulated oncogene* (GRO)-1, IL-10, MCP-3, IL-12p40, quimiocina derivada de macrófagos (MDC), IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1 α , IL-9, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, and TNF- β foram medidas através Multiplex, antes do tratamento e 1 mês após tratamento.

Das citocinas estudadas, 25 tinham concentrações baixas em todas as amostras, ou não foram encontradas em amostras suficientes para permitir um estudo comparativo (EGF, FGF-2, TGF- α , GM-CSF, FLT3, CX3CL1, IFN- α 2, IFN- γ , GRO-1, IL-10, MCP-3, IL-12p40, MDC, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1 α , IL-9, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, e TNF- β).

Nos doentes com edema central da mácula, uma concentração mais elevada de IP-10, antes do tratamento, associou-se a uma melhor resposta ao ranibizumab. Nos doentes com edema difuso, concentrações mais elevadas de GM-CSF, IP-10 e TNF α e

concentrações mais baixas de eotaxina-1, IL-5 e IL-8 associaram-se a melhor resposta ao tratamento.

Um mês após o tratamento, nos doentes com edema central, uma diminuição da concentração de IP-10 ou uma concentração mais elevada de MIP- α associaram-se a uma melhor resposta ao tratamento. Nos doentes com edema difuso, uma diminuição na concentração de IL-5, IL-8 e IP-10 ou concentrações mais elevadas de eotaxin-1 e MIP-1 β associaram-se a uma melhor resposta.

Discussão

VEGF

A via celular da citocina pro-angiogénica VEGF pode ser considerada uma peça-chave na fisiopatologia do edema macular diabético, facto corroborado pela elevada taxa de sucesso alcançado pelas terapêuticas com agentes anti-VEGF (h,j).

Concentrações mais elevadas de VEGF estão relacionadas com uma maior atividade da doença (avaliada por uma hiperfluorescência na angiografia com fluoresceína) e com maior gravidade da retinopatia diabética (a, b, c, j), apesar de não ter sido encontrada uma relação entre estes achados e a acuidade visual ou a espessura macular. Não existe uma relação entre concentrações mais elevadas de VEGF e uma menor acuidade visual, ou espessura macular superior. (c, j)

Não foi encontrada uma relação clara entre o padrão morfológico observado na tomografia de coerência ótica e a concentração de VEGF. (a,b,d,e,f)

As concentrações de VEGF previamente ao tratamento inaugural podem prever a resposta à terapêutica com agentes anti-VEGF. Concentrações mais elevadas relacionam-se com uma melhor resposta ao tratamento, enquanto concentrações menos elevadas têm taxas de sucesso inferiores. (h, j). Nestes doentes podem estar ativas outras vias, que não a do VEGF, ou simplesmente apresentarem danos que são irreversíveis.

O tratamento com agentes anti-VEGF leva a uma diminuição das concentrações de VEGF para valores infra fisiológicos, o que não se relaciona com a resposta ao tratamento nem com a remissão da doença. O mesmo se verifica com a resposta ao tratamento com corticosteroides. (g, h, i, j)

IL-6

A concentração da citocina pro-inflamatória IL-6 está aumentada em todos os doentes com edema macular diabético e os seus valores estão fortemente relacionados com os valores de VEGF, exceto nos doentes tratados com agentes anti-VEGF que, conseqüentemente, apresentam níveis artificialmente baixos de VEGF. Este facto atesta que o edema macular diabético é também uma doença inflamatória, e que a inflamação não é dependente de VEGF, apesar de haver uma correlação direta entre a ativação das duas vias.

Tal como o VEGF, concentrações mais elevadas de IL-6 estão relacionadas com uma maior atividade da doença (avaliado por uma hiperfluorescência na angiografia com fluoresceína) e com maior gravidade da retinopatia diabética (a, b, c, j), apesar de não ter sido encontrada uma relação entre estes achados e a acuidade visual ou a espessura macular. Não existe uma relação entre concentrações mais elevadas de IL-6 e uma menor acuidade visual, ou espessura macular superior. (c, j)

Entre os diferentes padrões morfológicos observados na tomografia de coerência ótica, o edema macular cístico parece estar associado a concentrações significativamente inferiores de IL-6 e o edema macular com descolamento seroso da retina a concentrações significativamente superiores.

A concentração de IL-6 não é significativamente afetada pelo tratamento com agentes anti-VEGF, mas níveis mais elevados da citocina estão associados a uma melhor resposta ao tratamento comparativamente a doentes com concentrações mais baixas de IL-6. O tratamento com corticosteroides provoca uma diminuição nos níveis de IL-6. (g, i)

ICAM-1

Foram encontradas concentrações elevadas da molécula de adesão ICAM-1 em todos os doentes com edema macular diabético. Vários estudos demonstraram que as concentrações de ICAM-1 foram as que se correlacionaram mais fortemente com a atividade da doença (através de hiperfluorescência na angiografia com fluoresceína), com a espessura central da mácula e com a acuidade visual. (c, f, g, j). Esta correlação não foi observada com nenhuma outra citocina estudada.

Ao nível da vasculatura da retina, é provável que a ICAM-1 desempenhe um papel fundamental na patogénese do edema macular diabético ao potenciar a adesão leucocitária, aumentar a permeabilidade vascular e promover a oclusão capilar. Em modelos animais com retinopatia diabética, a inibição da ICAM-1 levou a uma diminuição da leucostase e extravasão vascular, levando Miyamoto K *et al.* a propor a inibição da ICAM-1 como um potencial alvo terapêutico na doença diabética ocular.⁵³

A concentração de ICAM-1 não é significativamente afetada pelo tratamento com agentes anti-VEGF, mas níveis mais elevados estão associados a uma melhor resposta ao tratamento em comparação a doentes com concentrações mais baixas de ICAM-1. (j)

IL-8

A interleucina-8 é uma citocina pro-inflamatória e angiogénica, produzida pelas células endoteliais e da glia em condições de isquemia na retina. A IL-8 atua como fator quimiotático, atraindo neutrófilos e ativando células-T. Sabe-se igualmente, que induz a angiogénese.^{54,55}

Doentes com edema macular diabético apresentam concentrações aumentadas de IL-8 no humor vítreo e aquoso. Os doentes com edema macular cístico, apresentam concentrações médias de IL-8, tal como de IL-6, inferiores à média. Já os doentes com edema macular com descolamento seroso da retina apresentam concentrações de IL-8 e IL-6 superiores à média. (d,e,g,h)

O tratamento com agentes anti-VEGF, ao contrário dos corticosteroides, não diminuiu as concentrações de IL-8. (h,i)

MCP-1

A MCP-1 é uma quimiocina produzida pelas células endoteliais da retina, que atrai monócitos e macrófagos. A atividade da MCP-1 parece estar ligada à atividade do VEGF, uma vez que a expressão do gene VEGF-A é mediada pela MCP-1.⁵⁶

Os doentes com edema macular diabético apresentam concentrações elevadas de MCP-1, mas não foi encontrada uma correlação com a gravidade da doença ou com a morfologia.

A concentração de MCP-1 não é afetada pelo tratamento com agentes anti-VEGF, mas concentrações mais elevadas correlacionaram-se com uma melhor resposta ao tratamento. O tratamento com corticosteroides fez diminuir as concentrações de MCP-1. (h,i,j)

IP-10

A IP-10 é uma quimiocina anti-angiogénica induzida pelo interferão- γ que atua reduzindo a concentração de VEGF.⁵⁷

Doentes com edema macular diabético apresentam concentrações elevadas de IP-10 e concentrações mais elevadas apresentam uma melhor resposta ao tratamento com agentes anti-VEGF. A concentração de IP-10 diminui com o tratamento, e descidas mais acentuadas associam-se a melhor resposta.

Doentes com edema macular com descolamento seroso da retina parecem ter concentrações mais elevadas de IP-10. (e,j,l)

PIGF

O PIGF é um fator de crescimento pro-angiogénico, membro da superfamília VEGF, produzido pelas células do epitélio pigmentado da retina. Estruturalmente semelhante ao VEGF-A, vai ligar-se ao VEGFR-2, levando a uma disrupção na barreira hematorretiniana e extravasão vascular.⁵⁸

O fenofibrato, agonista do PPAR- α , demonstrou ser capaz de reduzir o risco de progressão de retinopatia diabética até 40%²⁴ e o principal mecanismo de ação poderá dever-se à inibição da produção PIGF,²⁵ o que demonstra a importância deste fator na sequência de eventos.

Doentes com edema macular diabético apresentam concentrações elevadas de PIGF.

A terapêutica anti-VEGF é eficaz na diminuição da concentração de PIGF e concentrações superiores relacionaram-se com uma boa resposta ao tratamento com agentes anti-VEGF.

sVEGFR1

Todos os membros da família do VEGF exercem o seu efeito através da ligação a recetores de tirosina-cinase na superfície celular, activando-os.⁵⁹ São conhecidos 3 recetores de VEGF: VEGFR1; VEGFR 2; VEGFR 3. O VEGFR3 é um mediador da linfangiogenese, não estando relacionado com a fisiopatologia do edema macular diabético. O VEGFR2 parece mediar a maioria das respostas celulares associadas ao VEGF. A função do VEGFR1 é, em parte, funcionar como modulador de VEGFR2. A disrupção da barreira hemato-retiniana relaciona-se com a atividade da VEGFR1.⁵⁸ Como seria expectável, concentrações mais elevadas de sVEGFR1 no humor aquoso, assim como de PIGF e VEGF, estão associadas a uma melhor resposta ao tratamento com agentes anti-VEGF. As concentrações de sVEGFR2, no entanto, não se relacionaram com a resposta ao tratamento. (j)

PEDF

Tal como o VEGF, o PEDF é produzido pelas células do epitélio pigmentado, tendo, no entanto, um efeito anti-angiogénico. Teoricamente, a ação desta citocina tem um efeito protetor contra a evolução do edema macular.

Foi medida uma concentração bastante inferior de PEDF nos doentes com edema macular diabético. Doentes diabéticos, sem retinopatia, apresentaram concentrações

semelhantes a não diabéticos. Estes resultados indiciam que a inibição de PEDF tem um papel central da fisiopatologia da retinopatia diabética e do edema macular diabético e poderá ser um importante alvo terapêutico.

Eotaxina-1

Concentrações mais baixas de eotaxina-1 associaram-se a uma melhor resposta ao tratamento anti- VEGF em doentes com edema macular difuso. Observou-se também um aumento da concentração associado ao sucesso da terapêutica. (1)

O mecanismo de ação da eotaxina-1 tem sido associado à degeneração macular associada à idade, particularmente à neovascularização coroideia. Foi reportado que o bloqueio da via de ação da eotaxina-1 é mais eficaz que o anti-VEGF no tratamento da neovascularização coroideia da degeneração macular associada à idade.⁶⁰ Este facto sustenta a hipótese de que estas vias são autónomas, e pode justificar a melhoria do edema macular diabético em doentes com baixa concentração de eotaxina-1.

TNF α

O TNF α contribui para a disfunção da barreira hematorretiniana através da regulação das proteínas das junções oclusivas nas células endoteliais. O TNF α também entra na cascata da extravasão vascular induzida pelo VEGF.⁶¹ A inibição do TNF α reduziu a leucostase, a disrupção da barreira hematorretiniana e a activação de NF- κ B na retina de diabéticos.⁶²

Foram detetadas concentrações aumentadas de TNF α em alguns doentes com edema macular diabético, mas existiu uma relação inversa entre a espessura macular e a concentração de TNF α (1)

Quadro 14 – Principais fatores alterados no edema macular diabético e suas características mais relevantes

	Concentração	Achados principais
VEGF	↑	Concentração mais elevada associada a melhor resposta a tratamento anti-VEGF
IL-6	↑	Concentração mais elevada associada a melhor resposta a tratamento anti-VEGF; Concentração inferior à média nos doentes com edema macular cístico – lesão irreversível?
ICAM-1	↑	Forte correlação direta entre espessura da mácula e concentração
IL-8	↑	Concentração superior à média nos doentes com descolamento seroso da retina; Concentração inferior à média nos doentes com edema macular cístico – lesão irreversível?
MCP-1	↑	Concentração mais elevada associada a melhor resposta a tratamento anti-VEGF
IP-10	↑	Concentração mais elevada associada a melhor resposta a tratamento anti-VEGF
PIGF	↑	Concentração mais elevada associada a melhor resposta a tratamento anti-VEGF
sVEGFR-1	↑	Concentração mais elevada associada a melhor resposta a tratamento anti-VEGF
PEDF	↓	Concentração diminuída nos doentes com edema macular diabético
Eotaxina-1	↓	Concentração mais elevada associada a pior resposta a tratamento anti-VEGF
TNF α	=	Relação inversa entre concentração e espessura da mácula, mas elevada em certos doentes

Fatores inflamatórios e angiogénicos e resposta ao tratamento

O edema macular diabético é provocado por alterações celulares inflamatórias e angiogénicas, que atuam de maneira independente e sinérgica. Uma vez que o tratamento com corticosteroides ou com agentes anti-VEGF atua na modulação destas vias, só o conhecimento antecipado dos mecanismos predominantes em cada doente pode prever a eficácia do tratamento instituído. O edema macular diabético é resistente ao tratamento em cerca de 30% dos casos.²⁹ O único método fiável e prático para determinar as vias fisiopatológicas mais ativas em cada doente é a análise do seu humor aquoso, colhido, por exemplo, aquando da primeira sessão de tratamento.

Os doentes com maior probabilidade de responder ao tratamento com agentes anti-VEGF apresentam características bem definidas, nomeadamente, concentrações mais elevadas de VEGF, PlGF, sVEGFR1, MCP-1, ICAM-1, IL-6 e IP-10. Estes têm, como seria de prever, uma grande ativação da via pro-angiogénica, mas também uma componente inflamatória muito marcada e que provou ser independente de VEGF. Este grupo parece englobar a maioria dos doentes com edema macular diabético, o que confirma a relevância da via do VEGF na patogénese do edema macular diabético.

O grupo de doentes em que o tratamento com anti-VEGF não é tão eficaz apresenta características mais heterogéneas. O facto de não haver uma expressão tão elevada dos marcadores referidos para o grupo anterior pode significar que estão ativas outras vias causadoras da doença (como a via da eotaxina-1) mas numa parte significativa dos doentes deverá significar que existem danos irreversíveis na retina.

O tratamento com corticosteroides afeta um espectro mais alargado de citocinas, tendo um efeito teoricamente mais poderoso que o tratamento anti-VEGF. No entanto, os estudos comparativos não demonstram uma diferença muito significativa entre a eficácia dos agentes anti-VEGF e os corticosteroides, o que, mais uma vez, apoia a hipótese de se tratarem de doentes com danos irreversíveis. Ainda assim, alguns doentes que não respondem bem ao tratamento com agentes anti-VEGF podem beneficiar do tratamento com corticosteroides, mas a informação existente não permite estabelecer o perfil desses doentes. A diminuição da taxa de complicações associada aos corticosteroides poderá impulsionar este tratamento e superar a terapêutica anti-VEGF.

Indivíduos com concentrações mais elevadas de Eotaxina-1 ou outras vias ainda desconhecidas, que respondem mal ao tratamento anti-VEGF, poderiam beneficiar de tratamento dirigido, mas são necessários mais estudos para esclarecer a verdadeira importância destas vias.

A concentração de PEDF, uma citocina com ação anti-angiogénica, antagonista do VEGF, está diminuída nos doentes com edema macular diabético. O estudo mais aprofundado do mecanismo envolvido na repressão da produção de PEDF poderá levar à descoberta de um promissor alvo terapêutico.

Algumas pistas apontam para uma possível relação entre a morfologia do edema macular diabético avaliada por tomografia de coerência ótica e a resposta ao tratamento. Apesar de se observar uma relação entre o edema difuso e uma concentração elevada de IL-8, e entre o edema cístico e concentrações mais baixas de IL-6 e IL-8, a informação disponível não permite tirar conclusões definitivas.

Conclusão

O edema macular diabético é caracterizado por alterações inflamatórias e angiogénicas que lesam a barreira hematorretiniana. A via da superfamília VEGF (essencialmente VEGF e PlGF), tem um papel central e deverá ser o principal mecanismo ativo na maioria dos doentes, realçando a importância e eficácia do tratamento anti-VEGF. Estes fármacos são mais eficazes em doentes com uma grande ativação da via inflamatória e angiogénica e em fases mais precoces da doença.

São necessários mais estudos para esclarecer o perfil de doentes que beneficiariam do tratamento com corticosteroides em comparação com o tratamento anti-VEGF, devido ao maior risco de complicações associadas.

Concentrações menos elevadas de citocinas inflamatórias e angiogénicas associam-se a pior resposta ao tratamento. Numa parte significativa dos doentes a ausência de resposta poderá dever-se à presença de danos irreversíveis e não à falha terapêutica. Noutros doentes, existirá uma predominância de vias acessórias, como a via da Eotaxina-1 ou outras, ainda desconhecidas.

Existem algumas limitações associadas a este estudo. A maior parte dos estudos revistos baseava-se em séries com poucos doentes, e sem um verdadeiro grupo de controlo de doentes saudáveis. Os indivíduos estudados eram na sua maioria doentes em tratamento e as citocinas medidas foram selecionadas por grupos de trabalho, havendo o risco de um viés de seleção condicionar os resultados obtidos e a nossa percepção da fisiologia da doença.

Existe ainda incerteza na compreensão de certas vias da fisiopatogénese do edema macular diabético. São necessários mais estudos para compreender melhor a relevância do PlGF na cascata angiogénica, uma vez que a terapêutica sistémica se revelou eficaz na diminuição da progressão da retinopatia diabética num grupo significativo de doentes. A eotaxina-1, associada principalmente à degeneração macular associada à idade, parece ter um papel relevante nos doentes que não respondem à terapêutica e apresenta-se como potencial alvo terapêutico. A modulação do PEDF, antagonista do VEGF, que se apresenta diminuído nos doentes com edema macular diabético, representa também um possível alvo terapêutico, com potencial para complementar, e até substituir, a terapêutica anti-VEGF e com corticosteroides. O avanço dos métodos de diagnóstico e imagem, como a OCT, tem potencial para ajudar a classificar os doentes de modo mais preciso e

associar alguns padrões, como por exemplo a presença de lesões císticas, ao prognóstico dos doentes e à resposta ao tratamento.

A análise da concentração de citocinas permite conhecer de antemão a probabilidade de sucesso da terapêutica anti-VEGF. A utilidade da caracterização dos doentes com edema macular diabético, e auxílio na decisão terapêutica, aumentará muito associada ao desenvolvimento de novos fármacos que permitam um tratamento personalizado evitando ciclos de tratamento com poucas hipóteses de sucesso.

Bibliografia

1. Prokofyeva E, Zrenner E. Epidemiology of major eye diseases leading to blindness in Europe: A literature review. *Ophthalmic Res.* 2012;47(4):171-188. doi:10.1159/000329603.
2. Kempen J, O'Colmain B, Leske M, et al. "The Prevalence of Diabetic Retinopathy Among adults in the United States". *Arch Ophthalmol.* 2004;122(4):552-563. doi:10.1001/archopht.122.4.552.
3. Moss SE, Klein R, Klein BEK. Ten-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology.* 1994;101(6):1061-1070. doi:10.1016/S0161-6420(88)32991-X.
4. Bressler SB, Glassman AR, Almkhatar T, et al. Five-Year Outcomes of Ranibizumab With Prompt or Deferred Laser Versus Laser or Triamcinolone Plus Deferred Ranibizumab for Diabetic Macular Edema. *Am J Ophthalmol.* 2016;164:57-68. doi:10.1016/j.ajo.2015.12.025.
5. Wells J a, Glassman AR, Ayala AR, et al. Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema. *N Engl J Med.* 2015;372(13):1193-1203. doi:10.1056/NEJMoa1414264.
6. Klaassen I, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res.* 2013;34:19-48. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.02.001.
7. Kuno N, Fujii S. Recent advances in ocular drug delivery systems. *Polymers (Basel).* 2011;3(1):193-221. doi:10.3390/polym3010193.
8. Murakami T, Frey T, Lin C, Antonetti DA. Protein kinase cbeta phosphorylates occludin regulating tight junction trafficking in vascular endothelial growth factor-induced permeability in vivo. *Diabetes.* 2012;61(6):1573-1583. doi:10.2337/db11-1367.
9. Titchenell PM, Lin C-M, Keil JM, Sundstrom JM, Smith CD, Antonetti DA. Novel atypical PKC inhibitors prevent vascular endothelial growth factor-induced blood-retinal barrier dysfunction. *Biochem J.* 2012;446(3):455-467. doi:10.1042/BJ20111961.

10. Rangasamy S, McGuire PG, Nitta CF, Monickaraj F, Oruganti SR, Das A. Chemokine mediated monocyte trafficking into the retina: Role of inflammation in alteration of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2014;9(10). doi:10.1371/journal.pone.0108508.
11. van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PHB, et al. Early neurodegeneration in the retina of type 2 diabetic patients. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(6):2715-2719. doi:10.1167/iovs.11-8997.
12. Hernández C, Bogdanov P, Corraliza L, et al. Topical administration of GLP-1 receptor agonists prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes. *Diabetes*. 2016;65(1):172-187. doi:10.2337/db15-0443.
13. Romero-Aroca P, Baget-Bernaldiz M, Pareja-Rios A, Lopez-Galvez M, Navarro-Gil R, Verges R. Diabetic Macular Edema Pathophysiology: Vasogenic versus Inflammatory. *J Diabetes Res*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/2156273.
14. ETDRS. Grading DR from Stereoscopic Color fundus Photographs - An extension of the Modified Airlie Housa Classification - ETDRS 10. *Ophthalmology*. 1991;98:786-806.
15. Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003;110(9):1677-1682. doi:10.1016/S0161-6420(03)00475-5.
16. Bolz M, Lammer J, Deak G, et al. SAVE: a grading protocol for clinically significant diabetic macular oedema based on optical coherence tomography and fluorescein angiography. *Br J Ophthalmol*. 2014;98(12):1612-1617. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-304564.
17. ETDRS. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Arch Ophthalmol*. 1985;103(12):1796-1806. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2866759>.
18. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XV. The long-term incidence of macular edema. *Ophthalmology*. 1995;102(1):7-16. doi:10.1016/S0161-6420(95)31052-4.
19. Bhagat N, Grigorian RA, Tutela A, Zarbin MA. Diabetic Macular Edema: Pathogenesis and Treatment. *Surv Ophthalmol*. 2009;54(1):1-32. doi:10.1016/j.survophthal.2008.10.001.
20. Browning DJ, Altaweel MM, Bressler NM, Bressler SB, Scott IU. Diabetic

- Macular Edema: What Is Focal and What Is Diffuse? *Am J Ophthalmol.* 2008;146(5). doi:10.1016/j.ajo.2008.07.013.
21. Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P. Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res.* 2004;36(5):241-249. doi:10.1159/000081203.
 22. Sjolie AK, Chaturvedi N. The retinal renin-angiotensin system: implications for therapy in diabetic retinopathy. *J Hum Hypertens.* 2002;16 Suppl 3:S42-6. doi:10.1038/sj.jhh.1001438.
 23. Mauer M, Zinman B, Gardiner R, et al. Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2009;361(1):40-51. doi:10.1056/NEJMoa0808400.
 24. Keech a C, Mitchell P, Summanen P a, et al. Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;370(9600):1687-1697. doi:10.1016/S0140-6736(07)61607-9.
 25. Gonsalves CS, Li C, Mpollo M-SEM, et al. Erythropoietin-mediated expression of placenta growth factor is regulated via activation of hypoxia-inducible factor-1 α and post-transcriptionally by *miR-214* in sickle cell disease. *Biochem J.* 2015;468(3):409-423. doi:10.1042/BJ20141138.
 26. ACCORD Study Group AESG, ACCORD Eye Study Group, Chew EY, et al. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2010;363(3):233-244. doi:10.1056/NEJMoa1001288.
 27. Gonzalez VH, Boyer DS, Schmidt-Erfurth U, et al. MICROPERIMETRIC ASSESSMENT OF RETINAL SENSITIVITY IN EYES WITH DIABETIC MACULAR EDEMA FROM A PHASE 2 STUDY OF INTRAVITREAL AFLIBERCEPT. *Retina.* 2015;35(4):687-694. doi:10.1097/IAE.0000000000000430.
 28. Yu L, Liang XH, Ferrara N. Comparing protein VEGF inhibitors: In vitro biological studies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;408(2):276-281. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.014.
 29. Wells JA, Glassman AR, Ayala AR, et al. Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema Two-Year Results from a Comparative Effectiveness Randomized Clinical Trial. *Ophthalmology.* 2016;123(6):1351-1359. doi:10.1016/j.ophtha.2016.02.022.
 30. Nguyen QD, Shah SM, Khwaja AA, et al. Two-year outcomes of the ranibizumab for edema of the mAcula in diabetes (READ-2) study. *Ophthalmology.*

- 2010;117(11):2146-2151. doi:10.1016/j.ophtha.2010.08.016.
31. Do D V., Nguyen QD, Khwaja A a, 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):139-145. doi:10.1001/2013.jamaophthalmol.91.
 32. Wilson AS, Hobbs BG, Shen WY, et al. Argon laser photocoagulation-induced modification of gene expression in the retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(4):1426-1434. doi:10.1167/iovs.02-0622.
 33. Ogata N, Tombran-Tink J, Jo N, Mrazek D, Matsumura M. Upregulation of pigment epithelium-derived factor after laser photocoagulation. *Am J Ophthalmol.* 2001;132(3):427-429. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11530069>.
 34. Jonas JB, Jonas R a., Neumaier M, Findeisen P. Cytokine Concentration in Aqueous Humor of Eyes With Diabetic Macular Edema. *Retina.* 2012;32(10):2150-2157. doi:10.1097/IAE.0b013e3182576d07.
 35. Beck RW, Edwards AR, Aiello LP, 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):245-251. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19273785&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1001/archophthalmol.2008.610%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2754047&tool=pmcentrez&rend>.
 36. Pearson PA, Comstock TL, Ip M, et al. Fluocinolone acetonide intravitreal implant for diabetic macular edema: A 3-year multicenter, randomized, controlled clinical trial. *Ophthalmology.* 2011;118(8):1580-1587. doi:10.1016/j.ophtha.2011.02.048.
 37. Dugel PU, Bandello F, Loewenstein A. Dexamethasone intravitreal implant in the treatment of diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol.* 2015;9:1321-1335. doi:10.2147/OPHTH.S79948.
 38. Golan S, Loewenstein A. Surgical treatment for macular edema. *Semin Ophthalmol.* 2014;29(4):242-256. doi:10.3109/08820538.2013.796394.
 39. Laidlaw D a H. Vitrectomy for diabetic macular oedema. *Eye (Lond).* 2008;22(10):1337-1341. doi:10.1038/eye.2008.84.
 40. Angi M, Kalirai H, Coupland SE, Damato BE, Semeraro F, Romano MR. Proteomic analyses of the vitreous humour. *Mediators Inflamm.* 2012;2012. doi:10.1155/2012/148039.
 41. Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Usefulness of the vitreous fluid analysis in

- the translational research of diabetic retinopathy. *Mediators Inflamm.* 2012;2012. doi:10.1155/2012/872978.
42. Gustavsson C, Agardh CD, Agardh E. Profile of intraocular tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in diabetic subjects with different degrees of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmologica.* 2013;91(5):445-452. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-3768.2012.02430.x.
 43. Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T, Mimura T, Eguchi S, Hori S. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2003;110(9):1690-1696. doi:10.1016/S0161-6420(03)00568-2.
 44. Funatsu H, Noma H, Mimura T, Eguchi S. Vitreous inflammatory factors and macular oedema. *Br J Ophthalmol.* 2012;96(2):302-304. doi:10.1136/bjo.2010.181222.
 45. Funatsu H, Noma H, Mimura T, Eguchi S, Hori S. Association of Vitreous Inflammatory Factors with Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology.* 2009;116(1):73-79. doi:10.1016/j.ophtha.2008.09.037.
 46. Sonoda S, Sakamoto T, Yamashita T, Shirasawa M, Otsuka H, Sonoda Y. Retinal morphologic changes and concentrations of cytokines in eyes with diabetic macular edema. *Retina.* 2014;34(4):741-748. doi:10.1097/IAE.0b013e3182a48917.
 47. Roh MI, Kim HS, Song JH, Lim JB, Kwon OW. Effect of Intravitreal Bevacizumab Injection on Aqueous Humor Cytokine Levels in Clinically Significant Macular Edema. *Ophthalmology.* 2009;116(1):80-86. doi:10.1016/j.ophtha.2008.09.036.
 48. Funk M, Schmidinger G, Maar N, et al. Angiogenic and inflammatory markers in the intraocular fluid of eyes with diabetic macular edema and influence of therapy with bevacizumab. *Retina.* 2010;30(9):1412-1419. doi:10.1097/IAE.0b013e3181e095c0.
 49. Sohn HJ, Han DH, Kim IT, et al. Changes in aqueous concentrations of various cytokines after intravitreal triamcinolone versus bevacizumab for diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol.* 2011;152(4):686-694. doi:10.1016/j.ajo.2011.03.033.
 50. Velez-Montoya R, Fromow-Guerra J, Burgos O, Landers 3rd MB, Morales-Caton V, Quiroz-Mercado H. The effect of unilateral intravitreal bevacizumab (avastin), in the treatment of diffuse bilateral diabetic macular edema: a pilot study. *Retina.*

- 2009;29(1):20-26. doi:10.1097/IAE.0b013e318186c64e.
51. Shimura M, Yasuda K, Motohashi R, Kotake O, Noma H. Aqueous cytokine and growth factor levels indicate response to ranibizumab for diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol.* 2017;(5 m):bjophthalmol-2016-309953. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309953.
 52. T. S, S. K, F. A, T. U, T. M. Aqueous cytokine levels are associated with reduced macular thickness after intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema. *PLoS One.* 2017 <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0174340&type=printable%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emex&NEWS=N&AN=615010333>.
 53. Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol.* 2000;156(5):1733-1739. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10793084.
 54. Taub DD, Anver M, Oppenheim JJ, Longo DL, Murphy WJ. T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8): IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1996;97(8):1931-1941. doi:10.1172/JCI118625.
 55. Jo N, Wu GS, Rao NA. Upregulation of chemokine expression in the retinal vasculature in ischemia-reperfusion injury. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(9):4054-4060. doi:10.1167/iovs.02-1308.
 56. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood.* 2005;105(4):1405-1407. doi:10.1182/blood-2004-08-3178.
 57. Liu G, Zhang W, Xiao Y, Lu P. Critical Role of IP-10 on Reducing Experimental Corneal Neovascularization. *Curr Eye Res.* 2015;40(9):891-901. doi:10.3109/02713683.2014.968934.
 58. Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, et al. Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 2007;50(2):461-470. doi:10.1007/s00125-006-0539-2.
 59. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth

- factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal.* 2007;19(10):2003-2012. doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013.
60. Takeda A, Baffi JZ, Kleinman ME, et al. CCR3 is a therapeutic and diagnostic target for neovascular age-related macular degeneration. *Nature.* 2009;460(7252):225-230. doi:10.1038/nature08151.CCR3.
61. Avelaira CA, Lin CM, Abcouwer SF, Ambrósio AF, Antonetti DA. TNF- α signals through PKC ζ /NF- κ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes.* 2010;59(11):2872-2882. doi:10.2337/db09-1606.
62. Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. *FASEB J.* 2002;16(3):438-440. doi:10.1096/fj.01-0707fje.