

Biomarcadores Pró-inflamatórios Sistêmicos no Edema Macular Diabético e a Resposta Anátomo-funcional ao Tratamento com Anti-VEGF

Pedro Brito¹; Jorge Costa¹; Nuno Gomes¹; Sandra Costa^{2,3}; Jorge Correia-Pinto^{2,3}; Rufino Silva^{4,5,6}

¹Ophthalmology Department, Hospital de Braga, Braga, Portugal

²Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, Campus Gualtar, Braga, Portugal

³ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

⁴Department of Ophthalmology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), Coimbra, Portugal

⁵Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Coimbra (ICBR- FMUC)

⁶Association for Innovation and Biomedical Research on Light and Image (AIBILI), Coimbra, Portugal

RESUMO

Objetivos: Estudar o papel de biomarcadores inflamatórios sistêmicos, como fatores condicionantes da resposta anátomo-funcional ao tratamento com bevacizumab no edema macular diabético (EMD).

Material e métodos: Estudo prospectivo que incluiu 30 doentes com EMD, tratados com injeções intravítreas de bevacizumab e com seguimento de 12 meses. Para todos os casos foi obtido um perfil analítico basal contemplando risco cardiovascular, disfunção renal, dislipidémia e controlo glicémico. Pela técnica ELISA, foram estudados os seguintes fatores pró-inflamatórios: VEGF, ICAM-1, MCP-1 e TNF- α . Os valores analíticos foram correlacionados com indicadores clínicos e tomográficos durante o seguimento.

Resultados: Verificamos melhoria significativa da espessura foveal central (EFC) (525.80 ± 136.80 μm para 363.31 ± 76.10 μm , $p < 0.001$), bem como da acuidade visual (AV) (0.61 ± 0.24 para 0.40 ± 0.19 LogMAR, $p < 0.001$). Estes resultados foram obtidos com uma média de 6.23 ± 1.20 injeções. O valor de proteína C reactiva ultrasensível (PCRus) foi preditivo de decréscimo na EFC $\leq 10\%$, ao 3º e 6º mês de seguimento (odds ratio 1.86 e 2.11, $p = 0.023$ e $p = 0.013$, respetivamente). O valor médio de EFC ao 6º mês correlacionou-se significativamente com os valores de: PCRus ($p = 0.026$, $r = 0.406$), ICAM-1 ($p = 0.042$, $r = 0.402$) e MCP-1 ($p = 0.021$, $r = 0.450$). Ao 6º mês verificamos que os casos com EFC < 330 μm apresentavam valores mais baixos de PCRus (1.03 ± 0.99 vs 2.63 ± 1.78 , $p = 0.006$), ICAM-1 ($1449,29 \pm 81,06$ vs $1329,88 \pm 138,94$, $p = 0.022$) e MCP-1 ($243,58 \pm 46,25$ vs $310,61 \pm 94,10$ $p = 0.024$). Quanto à AV final, verificamos por regressão linear que a AV inicial foi a variável mais preditiva da AV final ($p < 0.001$, $r^2 = 0.598$).

Conclusões: Os indicadores de atividade inflamatória sistémica (PCRus, ICAM-1, MCP-1) correlacionaram-se de forma negativa com o estado macular, sugerindo um efeito limitante na resposta ao tratamento com bevacizumab. O estudo de biomarcadores pró-inflamatórios poderá ser útil na identificação de casos com resposta fraca ou retardada aos agentes anti-VEGF.

Palavras-chave: anti-VEGF, bevacizumab, edema macular diabético, proteína C-reativa, inflamação

ABSTRACT

Objectives: To study the role of systemic inflammatory biomarkers as limiting factors for anatomic and functional response to treatment with intravitreal bevacizumab injections for diabetic macular edema (DME).

Material and methods: Prospective study including 30 cases with DME, treated with intravitreal bevacizumab injections with a clinical follow-up of 12 months. All cases underwent a baseline laboratory workup which included indicators of cardiovascular risk, renal function, dyslipidemia and glucose control. ELISA testing was performed for the following inflammatory biomarkers: VEGF, ICAM-1, MCP-1 e TNF- α . The analytic results were correlated with clinical and tomographic indicators during follow-up.

Results: A significant improvement in central foveal thickness (CFT) was verified ($525.80 \pm 136.80 \mu\text{m}$ to $363.31 \pm 76.10 \mu\text{m}$, $p < 0.001$), as well as in LogMAR visual acuity (VA) (0.61 ± 0.24 to 0.40 ± 0.19 , $p < 0.001$). This results were achieved with a mean of 6.23 ± 1.20 injections. High sensitivity C-reactive protein (hsCRP) was significantly predictive of a CFT decrease $\leq 10\%$, both at the third and sixth months of follow-up (odds ratio 1.86 and 2.11, $p = 0.023$ and $p = 0.013$, respectively). At the sixth month, CFT was significantly correlated with: hsCRP ($p = 0.026$, $r = 0.406$), ICAM-1 ($p = 0.042$, $r = 0.402$) and MCP-1 ($p = 0.021$, $r = 0.450$). Also at the 6th month, cases achieving CFT $< 330 \mu\text{m}$ had significantly lower values of hsCRP (1.03 ± 0.99 vs 2.63 ± 1.78 , $p = 0.002$) and MCP-1 ($243,58 \pm 46,25$ vs $310,61 \pm 94,10$ $p = 0.039$). Regarding final VA, linear regression revealed that initial VA was the most significantly predictive variable ($p < 0.001$, $r^2 = 0.593$).

Conclusions: The indicators of systemic inflammatory activity (hsCRP, ICAM-1, MCP-1) were negatively correlated with macular outcomes, suggesting a limiting effect on the response to treatment with bevacizumab. The study of pro-inflammatory biomarkers may be useful for the identification of low or delayed responders to anti-VEGF treatment.

Keywords: anti-VEGF, bevacizumab, diabetic macular edema, C-reactive protein, inflammation

INTRODUÇÃO

A retinopatia diabética (RD) é uma complicação microvascular da Diabetes Mellitus (DM) que constitui uma das principais causas de cegueira nos países desenvolvidos¹. Em Portugal, os dados mais recentes do Observatório Nacional da Diabetes indicam uma prevalência de 13.1% de

diabetes na população entre os 20 e 79 anos, sendo que a este resultado acrescem vários estudos populacionais que preveem um aumento marcado da prevalência de DM^{2,3}. O estudo nacional mais extenso sobre a prevalência de RD – RETINODIAB, avaliou o programa de rastreio da RD na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, tendo determinado uma prevalência de 16.3% numa população de

52739 diabéticos⁴. Dada a dimensão do problema, torna-se importante conhecer a eficácia das diversas modalidades terapêuticas disponíveis, bem como os possíveis fatores que possam condicionar a resposta clínica. O principal mecanismo de perda de visão na RD deve-se a alterações na barreira hemato-retiniana interna (BHI) induzidas por hiperglicémia prolongada, com consequente desenvolvimento de edema macular diabético (EMD). Efetivamente, o estudo ETDRS⁵ definiu, na década de 80, os critérios para o tratamento do EMD e da retinopatia diabética proliferativa, recorrendo ao laser argon, tendo sido demonstradas reduções significativas na probabilidade de perda visual moderada e severa, respetivamente. No entanto, a laserterapia não é um tratamento inócuo, sendo bem conhecidos efeitos laterais que podem condicionar diminuição da qualidade de visão⁷⁻⁹. Na última década, verificamos um crescente esforço de validação de novas modalidades terapêuticas, nomeadamente recorrendo a injeção intravítrea de agentes que modelam a atividade inflamatória inerente à patogénese da retinopatia diabética. Os dois agentes mais investigados são os inibidores do *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e várias formulações intravítreas de corticoesteróides. Estudos multicêntricos recentes (READ-2⁶, RESTORE⁷, DRCR.net Protocol I⁸), demonstraram que o tratamento com o agente anti-VEGF ranibizumab foi significativamente superior à laserterapia na diminuição de perda de visão e na probabilidade de ganho visual de 15 letras. Atualmente, apesar da validação inquestionável das injeções de anti-VEGF como tratamento de escolha, várias questões permanecem sem resposta. Efetivamente, um dos principais problemas relativos a estas novas terapias prende-se com a identificação do regime de administração terapêutica que permita obter o maior benefício com o menor esforço logístico. Estudos recentes indicam que é possível obter eficácia prolongada com um número médio de 7-9 injeções^{7,9}. Contudo, é interessante notar que, mesmo com esquemas rigorosos e prolongados de injeção mensal de anti-VEGF, apenas 40% dos doentes conseguiram atingir uma recuperação de acuidade visual de pelo menos 15 letras^{10,11}. Acresce que, adotando estratégias de tratamento baseadas em critérios clínicos, será de esperar uma percentagem considerável de casos (~34%) sem melhoria significativa da acuidade visual (AV)¹². De forma a otimizar os resultados clínicos, seria fundamental identificar fatores que permitissem prever o padrão de resposta à estratégia terapêutica implementada. Recentemente, o mecanismo

patogénico preponderante tem sido atribuído ao VEGF^{13,14}, responsável pelos fenómenos de hiperpermeabilidade vascular e angiogénese, tendo sido demonstrados níveis elevados no humor aquoso^{15,16}, vítreo^{17,18} e sangue^{19,20} de doentes com RD. Contudo, é importante ter em conta resultados de estudos que sugerem existir uma correlação entre certos biomarcadores inflamatórios e a gravidade das complicações de RD^{16,21}, bem como o facto de doentes pseudofáquicos tratados com corticoesteróide intravítrea apresentarem resultados clínicos similares aos doentes tratados com agente anti-VEGF²², sugerindo que múltiplos fatores pró-inflamatórios serão responsáveis pelas complicações da RD²³. Efetivamente, um outro fator molecular que tem sido estudado é o *Intracellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), associado aos fenómenos de leucostase^{20,24}, tendo sido também demonstrada expressão intraocular significativa, correlacionando-se com a presença de edema macular^{17,25,26}. São ainda relevantes alguns trabalhos que identificaram expressão significativa de *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1)²⁷, *Interleucina 6*²⁸, *Interleucina 8*²⁷ e *Tumor Necrosis factor α* (*TNF- α*)²⁹ no humor aquoso de doentes com EMD. Contudo, a obtenção de espécimes intraoculares para fins diagnósticos levanta questões de natureza logística e ética. Acresce que, a RD é uma manifestação local de uma doença sistémica, cujo curso clínico parece depender de várias variáveis metabólicas. Nomeadamente, o controlo glicémico, lipídico e tensional parecem fundamentais de forma a evitar a evolução para as formas mais severas de RD³⁰⁻³². Adicionalmente, tem surgido cada vez mais evidência de que a hiperglicémia e resistência à insulina que se verificam na DM tipo 2 parecem depender da existência de um estado inflamatório subclínico crónico identificado por níveis aumentados de proteína C reactiva (PCR)^{33,34}.

Partindo do princípio que o estado sistémico tem repercussão na doença ocular e que doentes com níveis intraoculares elevados de fatores pró-inflamatórios apresentam manifestações mais graves de RD, podemos colocar a hipótese de existir um papel prognóstico para o doseamento sistémico de biomarcadores metabólicos e pró-inflamatórios. Nesse sentido, pretendemos com este estudo avaliar a possível correlação entre os níveis séricos de vários fatores pró-inflamatórios e a evolução clínica do edema macular diabético em tratamento com injeções intravítreas de bevacizumab (BVZ).

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo prospectivo intervencional que decorreu numa população de doentes com DM tipo 2, e RD não proliferativa, referenciados ao Serviço de Oftalmologia do Hospital de Braga por edema macular diabético clinicamente significativo (EMCS) para iniciarem tratamento com injeções intravítreas. Todos os casos foram recrutados de forma consecutiva e seguidos durante um período mínimo de 12 meses. Os procedimentos clínicos e laboratoriais foram revistos e aprovados pela Comissão de Ética para a Saúde do Hospital de Braga. Os casos recrutados foram sujeitos a uma primeira consulta oftalmológica completa, sendo o diagnóstico confirmado por angiografia fluoresceínica e tomografia de coerência ótica *spectral-domain* (Spectralis, Heidelberg Engineering). Foram respeitados os seguintes critérios de inclusão: utentes com DM tipo 2 e retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) com EMD clinicamente significativo segundo os critérios definidos pelo ETDRS. Os critérios de exclusão incluíram: diagnóstico prévio de qualquer outra patologia ocular visualmente limitante, história de laserterapia ou procedimentos intraoculares recentes (<3 meses), diagnóstico de qualquer outra patologia inflamatória ou infecciosa sistémica, história de neoplasia maligna e ainda referência a eventos cardio ou cerebrovasculares agudos diagnosticados nos 12 meses prévios ao recrutamento. Para além do grupo patológico foi ainda incluído um grupo controlo constituído por indivíduos diabéticos tipo 2 há pelo menos 10 anos, mas sem qualquer sinal fundoscópico ou tomográfico de retinopatia ou maculopatia diabética. A inclusão deste grupo teve como objetivo determinar se os níveis basais de biomarcadores analíticos diferiam significativamente nos casos com EMD face aos diabéticos sem doença ocular.

Relativamente aos procedimentos clínicos, todos os casos iniciaram tratamento com BVZ intravítreo 1.25 mg, seguindo o esquema de 3 injeções mensais+*pro re nata*, de acordo com critérios clínicos e tomográficos. Todos os casos foram avaliados entre 1 a 3 meses, após início do tratamento, sendo as consultas completadas com SD-OCT. A técnica de aquisição de OCT consistiu em obter um scan foveal composto por 100 aquisições ponderadas e ainda o mapa macular (20x20°) obtido a partir de 25 linhas horizontais, correspondendo cada linha a uma imagem final resultante de 20 aquisições. Em todos os casos foi

selecionado o mapa macular inicial para que as imagens de seguimento fossem obtidas exatamente na mesma área macular. O valor obtido no mapa macular ETDRS, correspondente ao anel centrado na fóvea, com 1 mm de diâmetro, foi considerado como indicador da espessura foveal central (EFC), sendo ainda registado para todos os casos o valor correspondente ao volume macular (VM) e a espessura macular máxima.

Em todos os casos, foi considerada a seguinte estratégia relativamente à decisão de repetir ou suspender tratamentos:

Após as 3 injeções iniciais, foi considerada a suspensão de tratamento sempre que se verificasse, em duas consultas sucessivas, uma AV >20/25 independentemente da EFC, mas sem evidência de lesões císticas ou líquido subretiniano visíveis no OCT. Foi retomado o tratamento sempre que se verificasse aumento da EFC de pelo menos 100 µm relativamente ao exame anterior ou caso se verificasse uma diminuição de AV associada a qualquer alteração patológica no OCT. Considerou-se existir resposta clínica sempre que se verificou melhoria da AV de pelo menos 1 linha na tabela Snellen, associada a qualquer melhoria no OCT ou alternativamente uma redução da espessura foveal central (EFC) de pelo menos 11% face à espessura inicial. A partir do 6º mês de seguimento, caso se verificasse ausência de resposta foi admitido realizar tratamento com injeção intravítrea de triamcinolona.

Quanto aos procedimentos laboratoriais, todos os casos foram sujeitos a colheita de sangue para doseamento dos seguintes indicadores sistémicos: glicémia, % de hemoglobina glicosilada, colesterol LDL, colesterol HDL e colesterol total, creatinina, ureia, proteína C reactiva ultrasensível (PCRus) e homocisteína. Adicionalmente, para cada caso foi obtida uma amostra de sangue sujeita a centrifugação a 1000G durante 15 minutos, de forma a isolar a fração sérica, sendo esta armazenada imediatamente a -80°C, para posterior análise. O processamento e doseamento das amostras de soro, decorreu nos laboratórios do Departamento de Ciências Cirúrgicas do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde da Universidade do Minho. Todas as amostras foram analisadas pela técnica *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), usando kits específicos para deteção dos seguintes biomarcadores inflamatórios:

VEGF-A, ICAM-1, MCP-1/CCL2 e TNF- α (laboratórios Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA). As amostras foram preparadas de acordo com as indicações do fabricante, de forma a respeitar os limites de detecção para cada biomarcador. A absorvância luminosa foi quantificada num dispositivo leitor de micro pratos. Todas as amostras foram colhidas e processadas antes do início do tratamento intravítreo.

Os resultados registados foram submetidos a análise estatística utilizando o software IBM SPSS Statistics (version 23.0; SPSS, Inc, Chicago, IL), no sentido de averiguar a correlação entre os níveis dos vários biomarcadores analíticos doseados e indicadores de resposta clínica ao 3º, 6º e 12º mês de seguimento. Para esse efeito, os valores correspondentes à melhor acuidade visual corrigida (convertida em LogMAR) e ainda à EFC, variação de EFC e ao VM obtidos nos exames de OCTs, foram sujeitos aos testes estatísticos apropriados de forma a estudar o possível efeito dos níveis analíticos sistêmicos e pró-inflamatórios. Nos casos com EMD em tratamento bilateral, foram considerados para análise os resultados clínicos relativos ao olho com maior EFC inicial.

RESULTADOS

Foram incluídos 30 casos com RDNP e EMCS (14 mulheres e 16 homens), e ainda 10 controlos com DM2 sem sinais de RD (6 mulheres e 4 homens). A retinopatia foi classificada como moderada em 15 e severa nos restantes 15 casos, segundo a International Clinical Disease Severity Scale for Diabetic Retinopathy³⁵. Dos 30 casos incluídos, 27 apresentavam RDNP bilateral. No entanto, na análise estatística foi apenas incluído o olho com maior EFC de base.

Devido a limitações inerentes à metodologia dos kits ELISA, só foi possível fazer o doseamento dos biomarcadores pró-inflamatórios em 26 dos 30 casos com EMD (seleccionados de forma aleatória, correspondendo a 14 casos com RDNP moderada e 12 com RDNP severa), bem como na totalidade dos 10 controlos. Não se verificaram diferenças significativas na idade média, nem no tempo de diagnóstico de DM2. A tabela 1 resume os valores analíticos sistêmicos para ambos os grupos.

Tabela 1 - Resultados das variáveis demográficas, metabólicas e pró-inflamatórias

		N	Média	Desvio Padrão	Valor p
Idade	Controlo	10	64,60	4,90	0.350
	Caso	30	67,20	9,73	
Tempo DM2	Controlo	10	15,40	5,79	0.519
	Caso	30	17,00	6,99	
Tempo insulina	Controlo	6	6,66	2,33	0.826
	Caso	12	7,16	5,89	
VEGF (pg/ml)	Controlo	10	72,79	30,53	0.967
	Caso	26	73,31	34,88	
MCP-1 (pg/ml)	Controlo	10	325,85	111,44	0.284
	Caso	26	284,83	84,79	
ICAM-1 (pg/ml)	Controlo	10	1392,30	104,77	0.788
	Caso	26	1403,36	125,54	
TNF-α (pg/ml)	Controlo	10	0,062	0,081	0.712
	Caso	26	0,070	0,065	
PCRus (mg/L)	Controlo	10	1,25	0,66	0.346
	Caso	30	2,10	1,72	
Hest (mg/L)	Controlo	10	12,41	3,55	0.158
	Caso	30	14,99	4,08	
HBa1c (%)	Controlo	10	6,84	0,51	<0.001
	Caso	30	7,97	1,07	
Gluc (mg/dl)	Controlo	10	155,70	49,24	0.177
	Caso	30	175,36	50,08	
Creat (mg/dl)	Controlo	10	0,755	0,11	0.010
	Caso	30	1,06	0,77	
Ureia (mg/dl)	Controlo	10	44,20	10,05	0.890
	Caso	30	46,10	17,21	
LDL (mg/dl)	Controlo	10	97,22	26,59	0.169
	Caso	30	106,98	32,53	
HDL (mg/dl)	Controlo	10	51,40	5,12	0.167
	Caso	30	50,45	16,85	
colesT (mg/dl)	Controlo	10	162,60	48,18	0.253
	Caso	30	184,20	40,19	

De salientar que quanto aos indicadores metabólicos apenas se verificou diferença significativa no valor da hemoglobina glicosilada ($p < 0.001$) e creatinina ($p = 0.01$). Quanto aos biomarcadores inflamatórios não se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos. Contudo, no grupo com RDNP verificamos uma correlação direta significativa entre o grau de RDNP e o valor sérico de VEGF ($p = 0.024$), bem como a idade ($p = 0.004$). Ainda relevante, verificamos correlação significativa entre o tempo de DM2 e o valor de PCRus ($p = 0.016$, $r = 0.377$).

Relativamente ao estado macular, verificamos uma EFC inicial mediana de 490,00 μm (variando entre 351 a 892 μm), verificando-se uma melhoria significativa do valor de EFC em todos os pontos do seguimento, face ao valor inicial (Figura 1). Em termos de variação da EFC

(var.EFC) o valor mais expressivo verificado entre os intervalos de seguimento considerados, foi registado entre a primeira consulta e o 3º mês, com uma redução mediana de 77,00 µm face ao valor inicial (Figura 2). Na avaliação do 3º mês, verificamos que 11 dos 30 casos atingiram uma redução ≥ 25% da EFC face ao valor inicial, sendo que este resultado aumentou para 13 casos ao 6º mês e 14 casos ao 12º mês. Já em relação aos doentes não-respondedores, verificamos que aos 3 meses, 11 casos não foram além de uma redução da EFC ≤ 10% face ao valor inicial, valor que decresceu para 9 aos 6 meses e 12 meses. Verificamos uma EFC inferior a 330 µm em 7 dos 30 casos aos 3 meses, em 10 casos aos 6 meses e em 9 casos aos 12 meses. Quanto ao VM, verificou-se uma redução significativa do valor médio inicial de 11.13±2.28 mm³ para 9.39±1.12 mm³ ao 12º mês (p<0.001), sendo que a evolução entre os vários pontos de seguimento foi paralela à verificada para a EFC.

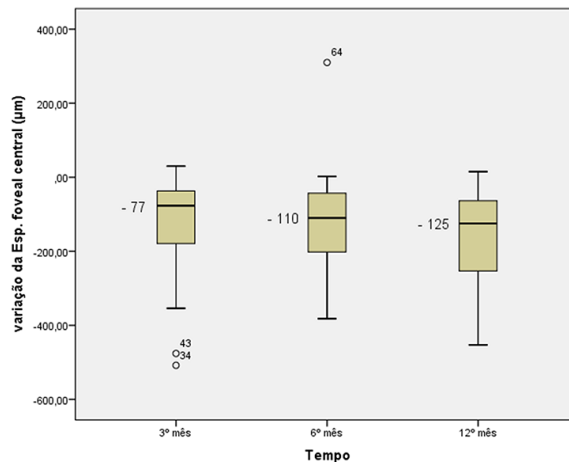


Figura 2 - O gráfico *boxplot* ilustra a variação média da espessura foveal central (var.EFC) ao longo do seguimento. Os valores a negrito correspondem ao percentil 50. Verificamos que em todos os pontos do seguimento houve uma redução da EFC, sendo mais expressiva logo ao 3º mês, ao qual se seguiram decréscimos progressivamente menos significativos.

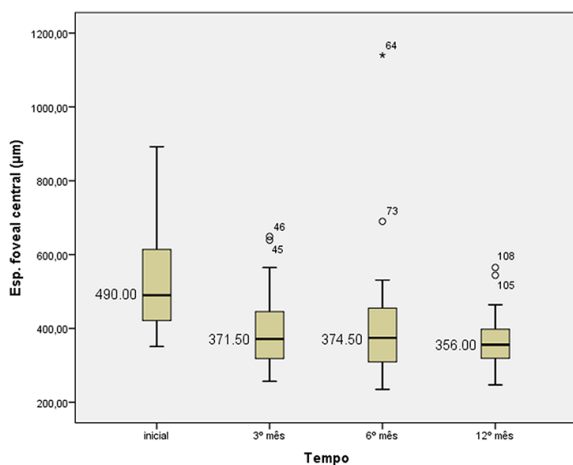


Figura 1 - O gráfico *boxplot* ilustra a evolução da espessura foveal central (EFC) em quartis, ao longo do tempo de seguimento clínico. Os valores a negrito correspondem ao percentil 50. Verificamos uma melhoria significativa da EFC ao 3º mês, seguindo-se um aumento não significativo ao 6º mês, p=0.743, correspondendo à primeira avaliação após início da estratégia de tratamento *pro re nata*. Ao 12º mês verificamos uma EFC mediana de 356.00 µm correspondendo a uma redução estatisticamente significativa face ao valor inicial (p<0.001)

Relativamente à recuperação visual, verificamos uma melhor acuidade visual corrigida (MAVC) mediana inicial de 0.60 logMAR, que melhorou significativamente para 0.40 logMAR ao 12º mês (p<0.001) (Figura 3). Uma MAVC final ≤ 0.3 LogMAR foi verificada em 11 casos (36.6%), enquanto que uma MAVC final ≥ 0.7 LogMAR ocorreu em apenas 2 casos (6.67%). Ao final do seguimento 19 casos obtiveram uma melhoria de MAVC ≥ 2 linhas, sendo que a MAVC inicial foi a única variável significativamente preditiva da obtenção deste resultado (p=0.026, R²=0.206, odds ratio = 15.7).

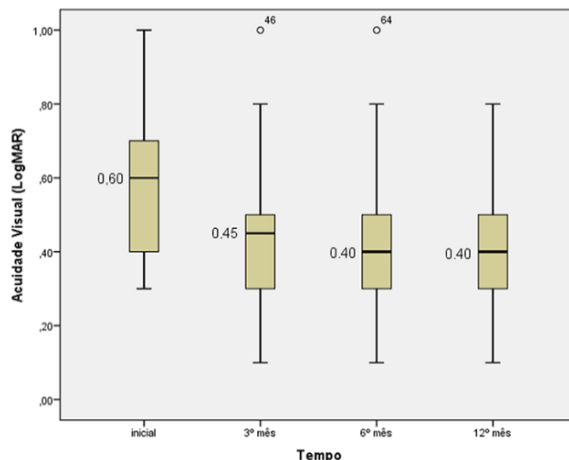


Figura 3 - O gráfico *boxplot* ilustra a acuidade visual em LogMAR ao longo do seguimento. Os valores a negrito correspondem ao percentil 50. Verificamos que a melhoria mais significativa ocorreu logo ao 3º mês (p<0.001), com melhoria pouco expressiva ao 6º mês (p=0.077) mantendo-se praticamente sobreponível ao 12º mês

Quanto à interação entre a EFC e a MAVC, verificamos que o valor de EFC inicial se correlacionou significativamente com a MAVC em todos os pontos de seguimento (maior valor $p=0.007$ ao 12º mês). Os casos que ao 12º mês atingiram uma MAVC ≤ 0.3 LogMAR apresentavam em média valores de EFC inicial significativamente mais baixos que os restantes (459.63 ± 114.24 vs $582.87 \pm 141.23 \mu\text{m}$, $p=0.02$), contudo não se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos, para os valores de EFC após início de tratamento.

Os resultados anátomo-funcionais descritos, foram alcançados com administração média de 6.23 ± 1.20 injeções intravítreas, correspondendo a uma média de 5.33 ± 1.00 injeções de bevacizumab e 0.90 ± 0.84 injeções de triamcinolona.

Interação biomarcadores e resposta macular

Relativamente à interação dos biomarcadores sistêmicos com os indicadores de resposta clínica, não verificamos qualquer correlação significativa com os valores iniciais de EFC, espessura macular máxima ou volume macular. Contudo, ao 3º mês de seguimento (após a loading dose de bevacizumab), verificamos que os casos com redução da EFC $\leq 10\%$ apresentavam valores de PCRus significativamente mais elevados que os casos com resposta macular significativa (3.30 ± 2.11 vs 1.51 ± 1.24 , $p=0.028$), sendo que por regressão logística, o valor de PCRus foi significativamente preditivo de resposta macular limitada ($p=0.023$, $R^2=0.192$, odds ratio=1.86).

Ao 6º mês de seguimento, os casos com redução da EFC $\leq 10\%$ continuavam a apresentar valores de PCRus significativamente mais elevados (3.36 ± 1.65 vs 1.47 ± 1.41 , $p=0.001$), sendo que este biomarcador foi novamente preditivo de resposta macular insuficiente ($p=0.013$, $R^2=0.248$, odds ratio=2.11). Acresce que, ao 6º mês de seguimento verificamos uma correlação direta entre a EFC e os valores de PCRus ($p=0.026$, $r=0.406$), ureia ($p=0.026$, $r=0.405$), MCP-1 ($p=0.021$, $r=0.450$) e ICAM-1 ($p=0.042$, $r=0.402$). A análise de regressão linear por seleção “stepwise” da variável independente, revelou que apenas a PCRus foi preditiva do valor de EFC ao 6º mês ($p=0.037$, $R^2=0.168$, Beta=0.41). Relativamente à variação de EFC ao 6º mês (var.EFC6), verificamos correlações significativas diretas com o tempo de DM2 ($p=0.044$, $r=0.370$), valor de PCRus ($p=0.009$, $r=0.466$), valor de MCP-1 ($p=0.032$, $r=0.421$) e ICAM-1 ($p=0.017$, $r=0.464$),

bem como correlação inversa com o VEGF sérico ($p=0.031$, $r=-0.424$). Contudo, a análise de regressão linear revelou que o modelo estatístico incluindo o valor de PCRus e ICAM-1 foi o mais preditivo da var.EFC6 ($p=0.002$, $R^2=0.419$, Beta_{PCRus}=0.345, Beta_{ICAM1}=0.492). Ainda relativamente aos resultados maculares, verificamos por regressão logística que o valor sérico de VEGF foi a única variável significativamente preditiva da ocorrência de um decréscimo $\geq 25\%$ da EFC ao 6º mês ($p=0.045$, $R^2=0.600$, odds ratios 1.096), sendo que este resultado foi independente da idade, tempo de DM2, glicémia e valor de HbA1c (Figura 4). Estudando a possibilidade de se verificar uma EFC inferior a $330 \mu\text{m}$, verificamos correlações significativas ao 6º mês com a idade, valor de PCRus, homocisteína, ureia, ICAM-1 e MCP-1 (Tabela 2), sendo que por regressão logística verificamos que apenas a PCRus se revelou negativamente preditiva de tal resultado ($p=0.042$, $R^2=0.233$, odds ratio = 0.372).

Ao final do seguimento, continuamos a verificar uma correlação significativa entre a EFC e o valor de PCRus ($p=0.045$, $r=0.375$), mas não com a var.EFC. Quanto à probabilidade de ocorrer um decréscimo de pelo menos 25% da EFC, ao 1º ano de seguimento, não se verificaram relações preditivas, embora o valor de VEGF foi novamente a variável com maior relevância estatística ($p=0.054$).

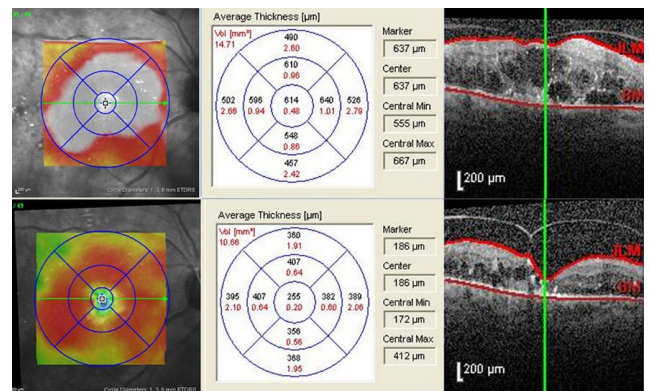


Figura 4 - Caso ilustrativo dos resultados verificados no estudo. As imagens correspondem ao OCT inicial (linha superior) e 6º mês (linha inferior) de uma mulher de 73 anos, com DM2 há 6 anos, que apresentava edema macular diabético e retinopatia diabética não proliferativa severa, com EFC de $614 \mu\text{m}$. Os resultados analíticos revelaram um VEGF sérico elevado 119.75 pg/ml , mas níveis baixos de PCRus de 0.68 mg/L , MCP-1 de 212 pg/ml e ICAM-1 1057 pg/ml . Com apenas 4 injeções de bevacizumab obteve uma redução 58% na EFC ao 6º mês, verificando-se um valor de $255 \mu\text{m}$ ao 6º mês e $252 \mu\text{m}$ ao 12º mês

Tabela 2 - Variáveis relacionadas com a obtenção de espessura foveal central $\leq 330 \mu\text{m}$ ao 6º mês

	EFC 6 < 330 μm	N	Média \pm Desvio padrão	Valor p. e coef. Corr.
Idade	Não	20	69,40 \pm 7,89	p = 0.043
	Sim	10	61,60 \pm 10,45	R = - 0.373
PCRus	Não	20	2,63 \pm 1,78	p = 0.006
	Sim	10	1,03 \pm 0,99	R = - 0.490
Hcst	Não	20	16,11 \pm 4,66	p = 0.038
	Sim	10	12,74 \pm 4,07	R = - 0.380
Ureia	Não	20	50,60 \pm 19,01	p = 0.036
	Sim	10	37,10 \pm 7,48	R = - 0.384
MCP-1	Não	16	310,61 \pm 94,10	p = 0.024
	Sim	10	243,58 \pm 46,25	R = - 0.443
ICAM-1	Não	16	1449,29 \pm 81,06	p = 0.022
	Sim	10	1329,88 \pm 138,94	R = - 0.447

Interação biomarcadores e MAVC

Não se verificou qualquer correlação significativa entre os vários fatores sistêmicos analisados e a MAVC inicial. No entanto, verificamos existirem correlações significativas entre a MAVC ao 6º mês e a idade ($p=0.001$, $r=0.584$), bem como com o valor de homocisteína ($p=0.012$, $r=0.453$). Sendo que estas correlações se mantiveram ao 12º mês ($p=0.005$ e $p=0.018$, respetivamente).

Dos biomarcadores pró-inflamatórios, o mais relevante para a MAVC foi o VEGF sérico, aproximando-se da significância estatística ao 12º mês ($p=0.05$, $r=0.389$). Efetivamente, por regressão linear *stepwise* verificamos que atendendo apenas às variáveis bioquímicas, o modelo combinado de VEGF e homocisteína foi significativamente preditivo da MAVC ao 12º mês ($p=0.005$, $R^2=0.372$), contudo a variável com maior significância estatística foi a MAVC inicial ($p<0.001$, $R^2=0.598$). Relativamente à probabilidade de obtermos uma MAVC ≤ 0.3 LogMAR, verificamos correlações significativas com as seguintes variáveis: MAVC inicial, EFC inicial e VEGF (Tabela 3). Por regressão logística verificamos que a única variável preditiva da MAVC final ≤ 0.3 LogMAR, foi a MAVC inicial, sendo este resultado se revelou independente da EFC inicial e dos parâmetros de glicémia, mas não da idade ($p=0.068$) ou do valor de VEGF sérico ($p=0.071$).

Tabela 3 – Variáveis relacionadas com a obtenção de acuidade visual ≤ 0.3 LogMAR ao 6º mês

	MAVC ≤ 0.3 LogMAR	N	Média \pm Desvio padrão	Valor p e coef. corr.
MAVC inicial	Não	19	0,70 \pm 0,23	p = 0.002
	Sim	11	0,45 \pm 0,17	R = -0.533
EFC inicial	Não	19	564,10 \pm 136,66	p = 0.012
	Sim	11	459,63 \pm 114,24	R = -0.452
VEGF	Não	16	84,32 \pm 35,51	p = 0.043
	Sim	10	55,70 \pm 26,80	R = -0.401

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho evidenciam aspetos importantes da influência do estado sistémico no prognóstico clínico do EMD. Efetivamente verificamos que entre o grupo com EMD e o grupo controlo apenas se verificou diferença significativa nos valores da HbA1c e creatinina o que salienta a importância da hiperglicémia sustentada na gênese das alterações que condicionam doença microvascular^{30,31}. Mais interessante, verificamos que no grupo com EMD parece existir uma importante relação entre biomarcadores pró-inflamatórios (PCRus, MCP-1 e ICAM-1) e parâmetros de resposta macular ao tratamento com bevacizumab, tonando-se esta relação mais expressiva ao 6º mês de seguimento. Na realidade este período de tempo, correspondeu à primeira avaliação após a introdução da estratégia de tratamento *pro re nata*, verificando-se recidiva de EMD em alguns dos casos que responderam favoravelmente à *loading dose* inicial e que acrescidos dos casos que continuavam a demonstrar resposta macular limitada, no conjunto explicam o porquê de termos verificado um ligeiro aumento da EFC mediana ao 6º mês. Tal resultado sugere que na prática clínica real, pelo menos de acordo com a metodologia seguida neste estudo, este período de tempo poderá corresponder ao momento no qual se verifica maior diferenciação nas possíveis respostas clínicas ao tratamento com BVZ. Efetivamente, foi recentemente publicado um documento de consenso³⁶ sobre o tratamento do EMD, no qual é sugerido que a partir do 6º mês de tratamento, se deve substituir a terapêutica com agentes anti-VEGF por implantes de corticoesteróides nos casos com redução do EMD inferior a 50%. Efetivamente neste trabalho, verificamos que os valores de ICAM-1, MCP-1 e PCRus se correlacionaram negativamente com o estado macular, sendo que o valor de PCRus se revelou preditivo de resposta macular insuficiente ($\leq 10\%$ redução da EFC) logo ao 3º mês de seguimento. No seu conjunto, estes resultados fornecem suporte laboratorial

objetivo para a importância do estado pró-inflamatório sistêmico na evolução do EMD, fundamentando as mais recentes recomendações baseadas na prática clínica.

Na realidade, a patogênese da RD é complexa e embora sejam conhecidos vários fatores que intervêm nas alterações patológicas, ainda não são completamente conhecidos os mecanismos que, desencadeados pelo desequilíbrio metabólico associado à DM, propiciam um estado patológico muitas vezes persistente e recidivante apesar do tratamento com os atuais agentes farmacológicos e/ou laserterapia. Nos últimos anos tem sido alvo de acesa investigação a existência de um estado pró-inflamatório como potenciador das alterações que levam à RD^{23,37}. Efetivamente, modelos experimentais demonstraram um papel importante atribuído à leucostase na gênese das alteração capilares que levam ao aumento da permeabilidade vascular³⁸, oclusão de capilares e apoptose das células endoteliais, com consequente isquemia da retina³⁹. Neste aspeto, é de salientar um estudo pioneiro que demonstrou experimentalmente que a administração de dexametasona intravítrea permitiu reduzir significativamente a acumulação de leucócitos nos capilares retinianos, bem como o grau de ruptura da BHI e ainda o nível de expressão da proteína ICAM-1⁴⁰. Posteriormente o estudo MEAD demonstrou a eficácia do implante de dexametasona no controlo do EMD⁴¹. No seu conjunto estes trabalhos demonstraram que além do VEGF, outros fatores celulares e moleculares intervêm nas alterações que condicionam disfunção da BHI.

No nosso estudo, o fator mais importante para o prognóstico anatómico, foi o nível de PCRus. Efetivamente, esta proteína correlacionou-se significativamente com uma redução insuficiente EFC ao 3º mês e 6º mês, correlacionando-se ainda com o valor de EFC ao 6º e ao 12º mês. Adicionalmente, é de de notar que a PCRus foi negativamente preditiva da probabilidade de ocorrer uma EFC inferior a 330 µm ao 6º mês. Estes resultados alertam para o papel da atividade inflamatória na evolução do EMD, sendo de referir uma análise recente ao estudo multicêntrico, randomizado – Diabetes Control and Complications Trial, na qual se verificou que indivíduos com valores de PCRus no quintil mais elevado apresentaram 83% mais EMD clinicamente significativo do que aqueles com valores no quintil mais baixo²¹. Contudo os resultados dessa análise foram verificados em indivíduos com DM tipo 1 sob controlo rigoroso da glicémia, podendo não traduzir os mecanismos patogénicos na população diabética em geral. Acresce que na literatura existente, os resultados relativamente ao papel da PCR na RD ainda não são unânimes⁴². Mesmo assim, parece existir evidência de que o

aumento sérico de produtos finais da glicosilação avançada, que se verifica na DM, se associa a níveis aumentados de PCR^{43,44}. Na realidade a PCR é considerada uma proteína de fase aguda, ou seja o seu nível aumenta no contexto de resposta inflamatória mediada por leucócitos, tendo como função facilitar fenómenos de apoptose celular, através da ativação do sistema de complemento. A análise ultrasensível da PCR permite detetar níveis muito baixos desta proteína no sangue, compatíveis com inflamação subclínica crónica. Efetivamente, trata-se de um biomarcador que tem sido amplamente utilizado em Cardiologia para prever risco de fenómenos cardiovasculares agudos⁴⁵. Mais interessante ainda, existe evidência experimental de que níveis aumentados de PCR induzem desregulação do endotélio vascular retiniano, interferindo com a vasodilatação mediada por óxido nítrico⁴⁶. Podemos então colocar a hipótese de, à semelhança do que se verifica na doença cardiovascular, os indivíduos que exibem respostas inflamatórias com níveis mais elevados de PCR, poderão estar mais suscetíveis ao desenvolvimento de doença vascular retiniana mais agressiva.

Fomentando esta hipótese, verificamos que o nível de MCP-1 e ICAM-1 também se correlacionaram com a resposta macular. Estas proteínas com ação pró-inflamatória desencadeiam fenómenos de migração e infiltração leucocitária, tendo sido demonstrados níveis elevados no humor aquoso e vítreo de doentes com EMD^{17,27}. Efetivamente, a expressão de ICAM-1 no endotélio retiniano aumenta em resposta a níveis elevados de VEGF, pelo que se acredita que ambos os fatores desempenhem papel de relevo nos fenómenos patológicos da RD, nomeadamente potenciando a leucostase⁴⁷. Recentemente, uma análise à população do estudo DCCT verificou uma associação significativa entre o nível de ICAM-1 e a ocorrência de exsudados duros²¹. Outros trabalhos têm demonstrado níveis elevados de ICAM-1 na retina e vítreo de olhos com RD, pelo que sabemos que se trata de um biomarcador fundamental na patogênese da RD^{20,24}. O fato de termos verificado correlações importantes entre os níveis de PCRus, MCP-1, ICAM-1 e o estado macular, alerta para importância da atividade pró-inflamatória no prognóstico clínico do EMD. Na realidade, sabemos que em monoterapia com anti-VEGF, seja com bevacizumab, ranibizumab ou aflibercept, apenas cerca de 40% dos doentes responderão com ganhos visuais de pelo menos 15 letras, sendo que estes resultados requerem rigorosa administração mensal do fármaco, correspondendo a um esquema terapêutico difícil de concretizar na prática clínica real. Este fato só por si, indica que numa percentagem significativa de casos com EMD existe um

preponderante componente patológico que não é, pelo menos diretamente mediado pelo VEGF. Atendendo aos resultados obtidos, podemos colocar a hipótese de nos casos com resposta macular limitada, existir uma predisposição genética ou sistemicamente determinada para uma resposta pró-inflamatória exacerbada, cursando com dano mais avançado e persistente na BHI, consequentemente limitando o potencial de resposta aos agentes anti-VEGF. Estes casos, seriam teoricamente mais responsivos a tratamentos com agentes anti-inflamatórios direccionados aos fenómenos de migração leucocitária, sendo que atualmente apenas os implantes intravítreos de corticoesteróides parecem conseguir esta acção⁴⁰. Neste contexto é importante relembrar os resultados do estudo FAME^{48,49} que demonstraram que a proporção de casos com melhoria na AV ≥ 15 letras foi significativa apenas no subgrupo tratado por EMD persistente há pelo menos 3 anos, sugerindo que no EMD crónico / recidivante é fundamental controlar o componente inflamatório da patogénese. Ainda neste sentido importa referir uma análise à frequência de tratamentos intravítreos na fase de extensão dos estudos RIDE/RISE, na qual se verificou que os casos com maior necessidade de tratamento (mais de 7 injeções) após os 3 anos do ensaio clínico, apresentavam EMD significativamente mais prolongado (34.8 vs 25.2 meses) do que aqueles que não requereram tratamentos adicionais⁵⁰. O fato de indivíduos com EMD prolongado continuarem a requerer anti-VEGF frequente, mesmo após 3 anos de tratamentos mensais com ranibizumab, indica que nestes casos a disfunção da BHR condicionada pelo aumento do VEGF não será o mecanismo patogénico preponderante. Os resultados do nosso estudo, ao demonstrarem níveis aumentados de vários biomarcadores pró-inflamatórios no casos com pior resposta anatómica ao tratamento com bevacizumab, fornecem evidência objetiva para os resultados clínicos verificados nos estudos multicêntricos previamente mencionados.

Finalmente, é ainda importante discutir, o fato de termos verificado uma tendência forte entre o valor de VEGF sérico e MAVC ao 12^o mês. Embora seja indiscutível o papel do VEGF na patogénese do EMD, estando bem documentada a sua expressão aumentada no vítreo e aquoso de olhos com EMD¹⁵⁻¹⁸, a verdade é que no que toca ao papel do VEGF sérico na RD, a literatura é ainda pouco clara. Efetivamente, uma meta-análise recente verificou que o VEGF sérico não surge aumentado de forma consistente nos estudos sobre RD, parecendo ter um papel menor como biomarcador sistémico de RD, do que o verificado para as moléculas de adesão celular⁵¹. Sabemos ainda que os níveis séricos de VEGF aumentam em

resposta a hipóxia, de forma a melhorar a perfusão tecidual, tendo sido demonstrado um efeito neuroprotector do VEGF na doença cerebral isquémica⁵². Uma vez que não admitimos casos com história de eventos isquémicos agudos nos 12 meses prévios ao recrutamento, podemos colocar a hipótese, de nos doentes com níveis de VEGF sérico mais elevado, existir um estado de isquemia sistémica crónica, que associado à doença ocular, poderá atuar como fator limitante da recuperação da função visual. Ainda no que toca à recuperação visual, parece existir um contributo importante do nível sérico de homocisteína, este aminoácido tem sido apontado como marcador de disfunção endotelial, favorecendo um estado protrombótico⁵³. Por outro lado sabemos que níveis elevados de homocisteína resultam de deficiência de vitamina B6 e B12, sendo que este défice nutricional é fator de risco para disfunção cognitiva e possivelmente demência⁵⁴. Neste sentido é de referir um trabalho que identificou uma relação importante entre o nível sérico de homocisteína e atrofia de camada de fibras nervosas da retina em indivíduos com retinopatia diabética⁵⁵. Embora não tenhamos analisado este parâmetro nos nossos resultados, podemos admitir que a recuperação visual mais limitada nos casos como homocisteína aumentada, poderá resultar de um efeito negativo ao nível da função neuroretiniana. Adicionalmente, o fato de termos verificado também um efeito limitante da idade na AV ao 6^o mês e 12^o mês, reforça a importância do estado cognitivo e neuronal na recuperação visual.

Em conclusão, acreditamos que este trabalho fornece dados fundamentais à problemática do tratamento do EMD, pois verificamos de forma objetiva que nos casos com EMD e resposta limitada ao bevacizumab, existem níveis séricos de biomarcadores pró-inflamatórios mais elevados do que nos casos com melhor resposta anatomo-funcional. De fato, os níveis elevados de ICAM-1, MCP-1 e PCRus verificados nos casos com valores de EFC mais elevados, indicam de forma inquestionável a existência de um estado inflamatório, no qual a mobilização e atuação de leucócitos parece ser mais importante do que a vasopermeabilidade e angiogénese mediadas pelo VEGF. Estes resultados podem explicar a razão de grande parte da população com EMD não exibir resposta completa e duradoura ao tratamento com anti-VEGF em monoterapia. Contudo temos como fator limitante o fato de amostra ainda ser diminuta. Ao continuarmos a seguir estes casos e com o reforço contínuo da dimensão da amostra, poderemos aferir o verdadeiro valor preditivo destes biomarcadores, bem como estabelecer correlações mais precisas com o frequência e tipo de tratamentos maculares

efetuados. A continuidade deste tipo de trabalhos será fundamental ao esclarecimento dos fenómenos patológicos mais pertinentes no EMD, tendo como objetivo permitir a otimização de estratégias terapêuticas mais indicadas a cada perfil clínico.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Sociedade Portuguesa de Oftalmologia pela atribuição da Bolsa de Doutoramento ao projeto de investigação no qual este trabalho está inserido. Gostaríamos também de agradecer ao Centro Clínico Académico (2CA) do Hospital de Braga, em particular à enfermeira Ana Monteiro pelo apoio prestado na colheita e preparação das amostras de soro analisadas.

Este artigo foi elaborado no âmbito do projeto NORTE-01-0145-FEDER-000013, da Northern Portugal Regional Operational Programme (NORTE 2020), sob o acordo Portugal 2020 Partnership Agreement, através da European Regional Development Fund (FEDER). Este trabalho foi financiado pela FEDER, através do programa Competitiveness Factors Operational Programme (COMPETE), e pro fundos nacionais, através da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), no âmbito do projeto POCI-01-0145-FEDER-007038.

CONCLUSÃO

Com a realização deste estudo, constatou-se que a terapia visual é eficaz no tratamento da insuficiência de convergência, tendo uma diminuição significativa dos sintomas, como fadiga ocular, cefaleias, visão turva, diplopia, sonolência, ardor, produção excessiva de lágrimas, dificuldade de concentração, dificuldade de compreensão após curtos períodos de leitura ou após atividades que requerem uso prolongado da visão de perto, além de reduzir o ponto próximo de convergência.

REFERÊNCIAS

1. Latinovic S. Global initiative for the prevention of blindness: Vision 2020—the Right to Sight. *Medicinski preglod* 2006;59:207-12.
2. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice* 2014;103:137-49.
3. Ginter E, Simko V. Global prevalence and future of diabetes mellitus. *Advances in experimental medicine and biology* 2012;771:35-41.
4. Dutra Medeiros M, Mesquita E, Papoila AL, Genro V, Raposo JF. First diabetic retinopathy prevalence study in Portugal: RETINODIAB Study—evaluation of the screening programme for Lisbon and Tagus Valley region. *The British journal of ophthalmology* 2015;99:1328-33.
5. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Archives of ophthalmology* 1985;103:1796-806.
6. 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;117:2146-51.
7. Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U, et al. The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2011;118:615-25.
8. Diabetic Retinopathy Clinical Research N, Elman MJ, Qin H, et al. Intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema with prompt versus deferred laser treatment: three-year randomized trial results. *Ophthalmology* 2012;119:2312-8.
9. Michaelides M, Kaines A, Hamilton RD, et al. A prospective randomized trial of intravitreal bevacizumab or laser therapy in the management of diabetic macular edema (BOLT study) 12-month data: report 2. *Ophthalmology* 2010;117:1078-86 e2.
10. Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, et al. Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology* 2012;119:789-801.
11. Brown DM, Schmidt-Erfurth U, Do DV, et al. Intravitreal Aflibercept for Diabetic Macular Edema: 100-Week Results From the VISTA and VIVID Studies. *Ophthalmology* 2015;122:2044-52.
12. Gonzalez VH, Campbell J, Holekamp NM, et al. Early and Long-Term Responses to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Diabetic Macular Edema: Analysis of Protocol I Data. *Am J Ophthalmol* 2016;172:72-9.

13. Wirostko B, Wong TY, Simo R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Progress in retinal and eye research* 2008;27:608-21.
14. Tanaka Y, Katoh S, Hori S, Miura M, Yamashita H. Vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Lancet* 1997;349:1520.
15. 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;116:80-6.
16. Funatsu H, Yamashita H, Noma H, Mimura T, Yamashita T, Hori S. Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema. *American journal of ophthalmology* 2002;133:70-7.
17. Funatsu H, Noma H, Mimura T, Eguchi S, Hori S. Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2009;116:73-9.
18. 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;110:1690-6.
19. Ozturk BT, Bozkurt B, Kerimoglu H, Okka M, Kamis U, Gunduz K. Effect of serum cytokines and VEGF levels on diabetic retinopathy and macular thickness. *Molecular vision* 2009;15:1906-14.
20. Meleth AD, Agron E, Chan CC, et al. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2005;46:4295-301.
21. Muni RH, Kohly RP, Lee EQ, Manson JE, Semba RD, Schaumberg DA. Prospective study of inflammatory biomarkers and risk of diabetic retinopathy in the diabetes control and complications trial. *JAMA ophthalmology* 2013;131:514-21.
22. Diabetic Retinopathy Clinical Research N, Elman MJ, Aiello LP, et al. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2010;117:1064-77 e35.
23. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research* 2011;30:343-58.
24. McLeod DS, Lefler DJ, Merges C, Luttly GA. Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *The American journal of pathology* 1995;147:642-53.
25. Funatsu H, Yamashita H, Sakata K, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule 1 are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2005;112:806-16.
26. Jonas JB, Jonas RA, Neumaier M, Findeisen P. Cytokine concentration in aqueous humor of eyes with diabetic macular edema. *Retina* 2012;32:2150-7.
27. 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;30:1412-9.
28. Oh IK, Kim SW, Oh J, Lee TS, Huh K. Inflammatory and angiogenic factors in the aqueous humor and the relationship to diabetic retinopathy. *Current eye research* 2010;35:1116-27.
29. Kocabora MS, Telli ME, Fazil K, et al. Serum and Aqueous Concentrations of Inflammatory Markers in Diabetic Macular Edema. *Ocular immunology and inflammation* 2015:1-6.
30. Diabetes C, Complications Trial Research G, Nathan DM, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 1993;329:977-86.
31. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *British journal of clinical pharmacology* 1999;48:643-8.
32. Chew EY, Klein ML, Ferris FL, 3rd, et al. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. Archives of ophthalmology* 1996;114:1079-84.
33. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama* 2001;286:327-34.
34. Dehghan A, Kardys I, de Maat MP, et al. Genetic variation, C-reactive protein levels, and incidence of diabetes. *Diabetes* 2007;56:872-8.
35. Wilkinson CP, Ferris FL, 3rd, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003;110:1677-82.
36. Regillo CD, Callanan DG, Do DV, et al. Use of Corticosteroids in the Treatment of Patients With Diabetic Macular Edema Who Have a Suboptimal Response to Anti-VEGF: Recommendations of an Expert Panel. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2017;48:291-301.

37. Spijkerman AM, Gall MA, Tarnow L, et al. Endothelial dysfunction and low-grade inflammation and the progression of retinopathy in Type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2007;24:969-76.
38. Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, et al. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *The Journal of cell biology* 1996;135:497-510.
39. Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, et al. Suppression of Fas-FasL-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003;17:76-8.
40. Tamura H, Miyamoto K, Kiryu J, et al. Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 2005;46:1440-4.
41. Boyer DS, Yoon YH, Belfort R, Jr., et al. Three-year, randomized, sham-controlled trial of dexamethasone intravitreal implant in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2014;121:1904-14.
42. Streja D, Cressey P, Rabkin SW. Associations between inflammatory markers, traditional risk factors, and complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes and its complications* 2003;17:120-7.
43. Tan KC, Chow WS, Tam S, Bucala R, Betteridge J. Association between acute-phase reactants and advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetes care* 2004;27:223-8.
44. Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, et al. Serum levels of sRAGE, the soluble form of receptor for advanced glycation end products, are associated with inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *Molecular medicine* 2007;13:185-9.
45. Yeh ET, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation* 2003;107:370-1.
46. Nagaoka T, Kuo L, Ren Y, Yoshida A, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of retinal arterioles via enhanced superoxide production. *Investigative ophthalmology & visual science* 2008;49:2053-60.
47. Jousseaume AM, Poulaki V, Le ML, et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004;18:1450-2.
48. Cunha-Vaz J, Ashton P, Iezzi R, et al. Sustained delivery fluocinolone acetonide vitreous implants: long-term benefit in patients with chronic diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2014;121:1892-903.
49. Chakravarthy U, Yang Y, Lotery A, et al. Clinical Evidence of the Multifactorial Nature of Diabetic Macular Edema. *Retina* 2017.
50. Wykoff CC, Elman MJ, Regillo CD, Ding B, Lu N, Stoilov I. Predictors of Diabetic Macular Edema Treatment Frequency with Ranibizumab During the Open-Label Extension of the RIDE and RISE Trials. *Ophthalmology* 2016;123:1716-21.
51. McAuley AK, Sanfilippo PG, Hewitt AW, et al. Vitreous biomarkers in diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis. *Journal of diabetes and its complications* 2014;28:419-25.
52. Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *The Journal of clinical investigation* 2003;111:1843-51.
53. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thrombosis and haemostasis* 1999;81:165-76.
54. Stanger O, Fowler B, Piertz K, et al. Homocysteine, folate and vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations. *Expert review of neurotherapeutics* 2009;9:1393-412.
55. Srivastava K, Saxena S, Mahdi AA, et al. Increased serum level of homocysteine correlates with retinal nerve fiber layer thinning in diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2016;22:1352-60.

CONTACTO

Pedro Silva Brito
Serviço de Oftalmologia, Hospital de Braga,
Rua das Sete Fontes
4710-243 Braga, Portugal
E-mail: pbritomd@hotmail.com

Sem conflitos de interesse a declarar