

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de  
Cabeça e Pescoço

# Bevacizumabe intravítreo no tratamento da retinopatia diabética

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
para obtenção do título de livre-docente

**Rodrigo Jorge**

Ribeirão Preto

2007

Jorge R.

Bevacizumabe intravítreo no tratamento da retinopatia diabética/Rodrigo Jorge. Ribeirão Preto, 2007. 163p.;30cm

Tese (Livre-docência) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Descritores: 1.Diabetes 2.Retina 3.Angiogênese 4.Fator de crescimento vaso-endotelial (VEGF) 5. Drogas antiangiogênicas 6. Bevacizumabe 7.Retinopatia diabética

À família, aos amigos e  
ao cotidiano vivido com eles

# ÍNDICE

## 1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia da retina.....	1
1.2 Angiogênese.....	6
1.2.1 Angiogênese patológica.....	8
1.2.2 Fatores Angiogênicos.....	9
1.2.3 Fator de crescimento vasoendotelial (VEGF).....	11
1.3 Doenças vasculares da retina.....	14
1.4 Retinopatia Diabética.....	15
1.4.1 Epidemiologia.....	15
1.4.2 Fisiopatogenia.....	18
1.4.3 Achados oftalmológicos e classificação.....	21
1.4.4 Tratamento da retinopatia diabética.....	26
1.4.4.1 Hipofisectomia.....	26
1.4.4.2 Fotocoagulação a <i>LASER</i> .....	27
1.4.4.3 Vitrectomia via <i>pars plana</i> .....	32
1.4.4.4 Agentes anti-VEGF.....	34
<b>2 BEVACIZUMABE E RETINOPATIA DIABÉTICA PROLIFERATIVA .....</b>	<b>42</b>
2.1 <i>Intravitreal bevacizumab (avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study)</i> .....	44
2.2 <i>Pan-retinal photocoagulation (PRP) versus PRP plus intravitreal bevacizumab (Avastin®) for high-risk proliferative diabetic retinopathy (IBEHI study)</i> .....	55



<b>3 BEVACIZUMABE E GLAUCOMA NEOVASCULAR.....</b>	<b>78</b>
3.1 <i>Short-term results of intravitreal bevacizumab (Avastin®) on anterior segment neovascularization in neovascular glaucoma.....</i>	<i>79</i>
<b>4 BEVACIZUMABE E EDEMA MACULAR DIABÉTICO.....</b>	<b>83</b>
4.1 <i>Intravitreal triamcinolone versus bevacizumab for treatment of refractory diabetic macular edema (IBEME study).....</i>	<i>85</i>
<b>5 DOR ASSOCIADA A INJEÇÃO INTRAVÍTREA DE BEVACIZUMABE.....</b>	<b>108</b>
5.1 <i>Comparative study of analgesic effectiveness using three different anesthetic techniques for intravitreal injection of bevacizumab.....</i>	<i>110</i>
<b>6 ANTIANGIOGÊNESE E RETINOPATIA DIABÉTICA: NOVAS PERSPECTIVAS.....</b>	<b>134</b>
6.1 <i>Edema macular diabético.....</i>	<i>134</i>
6.2 <i>Retinopatia Diabética Proliferativa.....</i>	<i>136</i>
6.3 <i>Dispositivos de liberação prolongada de anti-angiogênicos.....</i>	<i>139</i>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>141</b>

## **Lista de Abreviaturas**

**AMD**-Age related macular degeneration

**ANCHOR**-Anti-VEGF antibody for the treatment of predominantly classic choroidal neovascularization in age-related macular degeneration

**ANVISA**-Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**DMRI**-Degeneração Macular Relacionada à Idade

**DRS**-*Diabetic retinopathy study*

**DRVS**-*Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study*

**EPR**: Epitélio pigmentado da retina

**ETDRS**-*Early treatment diabetic retinopathy study*

**FDA**-*Food and Drug Administration*

**FGF**-*Fibroblast growth factor*

**FMRP**-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**HCFMRP-USP**-Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**IGF**-*Insulin-like growth factor*

**IRMA**-*Intraretinal microvascular abnormalities*

**MARINA**-*Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the treatment of neovascular AMD*

**NVC**-Neovascularização de coróide

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

**PIER**-*Phase IIIb, Multicenter, Randomized, Double-Masked, Sham-Injection-Controlled Study of the Efficacy and Safety of Ranibizumab in Subjects with*

*Subfoveal Choroidal Neovascularization with or without Classic CNV Secondary to Age-Related Macular Degeneration*

**PrONTO**-*Prospective optical coherence tomography (OCT) imaging of patients with neovascular AMD treated with intra-ocular Lucentis<sup>®</sup>*

**PRP**-*Pan retinal photocoagulation*

**RNA**: Ácido ribonucleico

**SAILOR**-*Safety assessment of intravitreal Lucentis<sup>®</sup> for age-related macular degeneration*

**PubMed**-Arquivo digital gratuito de literatura biomédica, desenvolvido pela livraria nacional de medicina dos Estados Unidos da América

**USP**-Universidade de São Paulo

**VEGF**-*Vascular Endothelial Growth Factor*



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Anatomia da retina

Um breve resumo sobre a estrutura anatômica da retina é necessário para a compreensão do assunto deste trabalho. A maioria das informações sobre a morfofisiologia da retina foram retiradas da clássica obra de Hogan, Alvarado e Weddell (HOGAN et al., 1971).

O nome retina provém do latim *rete*, que significa *rede*. A retina é um tecido fino e transparente, correspondendo à camada mais interna do globo ocular. Sua superfície interna está em contato com o corpo vítreo. Posteriormente, todas as camadas, exceto a camada de fibras nervosas, terminam no nervo óptico. Anteriormente, estende-se em direção ao corpo ciliar. Externamente, encontra-se em contato com a membrana de Bruch da coróide.

Trata-se da estrutura, funcionalmente, responsável pela captação e transdução dos estímulos luminosos, para a qual utiliza células receptoras específicas, denominadas fotorreceptores. Esses podem ser divididos em dois tipos básicos: cones e bastonetes. Essas células são altamente especializadas e complexas, contendo fotopigmentos que absorvem a luz e a transformam em impulsos elétricos.

Microscopicamente, a retina humana é formada por 10 camadas, cuja disposição da mais externa para interna é mostrada abaixo (Figura1).

1) O epitélio pigmentado da retina (EPR) é uma monocamada de células cubóides. Além de desempenhar papel fundamental no metabolismo da retina,

reciclando o pigmento visual (WALD, 1968), contém grânulos de melanina que absorvem a luz e evitam o reflexo da mesma para o interior da cavidade vítrea.

2) A camada de fotorreceptores (CFR) é composta por segmentos internos e externos dos cones e bastonetes. O segmento interno de fotorreceptores é constituído predominantemente por organelas celulares, incluindo mitocôndrias, que abastecem energeticamente o seguimento externo, região onde se concentra o pigmento visual responsável pela captação do estímulo luminoso.

3) A membrana limitante externa (MLE) é um aspecto de microscopia óptico dado pelo alinhamento de múltiplas *zonulae adherentes* que, mais freqüentemente, unem segmentos internos de cones e bastonetes à porção mais posterior das células de Müller, também unem células de Müller a células de Müller e, mais raramente, fotorreceptor a fotorreceptor (COHEN, 1965).

4) A camada nuclear externa (CNE) é formada pelos núcleos dos fotorreceptores.

5) A camada plexiforme externa (CPE) é composta de sinapses entre os axônios dos cones e dos bastonetes com os dendritos das células bipolares, horizontais e amácrinas.

6) A camada nuclear interna (CNI) contém os corpos celulares das células bipolares, células horizontais, células amácrinas e células de Müller. As células amácrinas e horizontais possuem longas terminações (dendritos e axônios) para contato com outras células, visando a associação do estímulo elétrico, proveniente dos fotorreceptores. As células bipolares representam os neurônios de primeira ordem no

sistema de condução do estímulo luminoso e as células de Muller têm função de nutrição e suporte estrutural. Não há estratificação da camada em relação aos tipos celulares acima, com exceção das células horizontais que, geralmente, se encontram na subcamada mais externa, adjacente á camada plexiforme externa (BOYCOTT & DOWLING, 1969).

7) A camada plexiforme interna (CPI) formada, principalmente, pelos axônios das células bipolares e dendritos das células ganglionares., corresponde à área de sinapses entre as células bipolares, amácrinas e horizontais com as células ganglionares.

8) A camada ganglionar (CG) é aquela que contém os corpos das células ganglionares, que representam os neurônios de segunda ordem das vias ópticas.

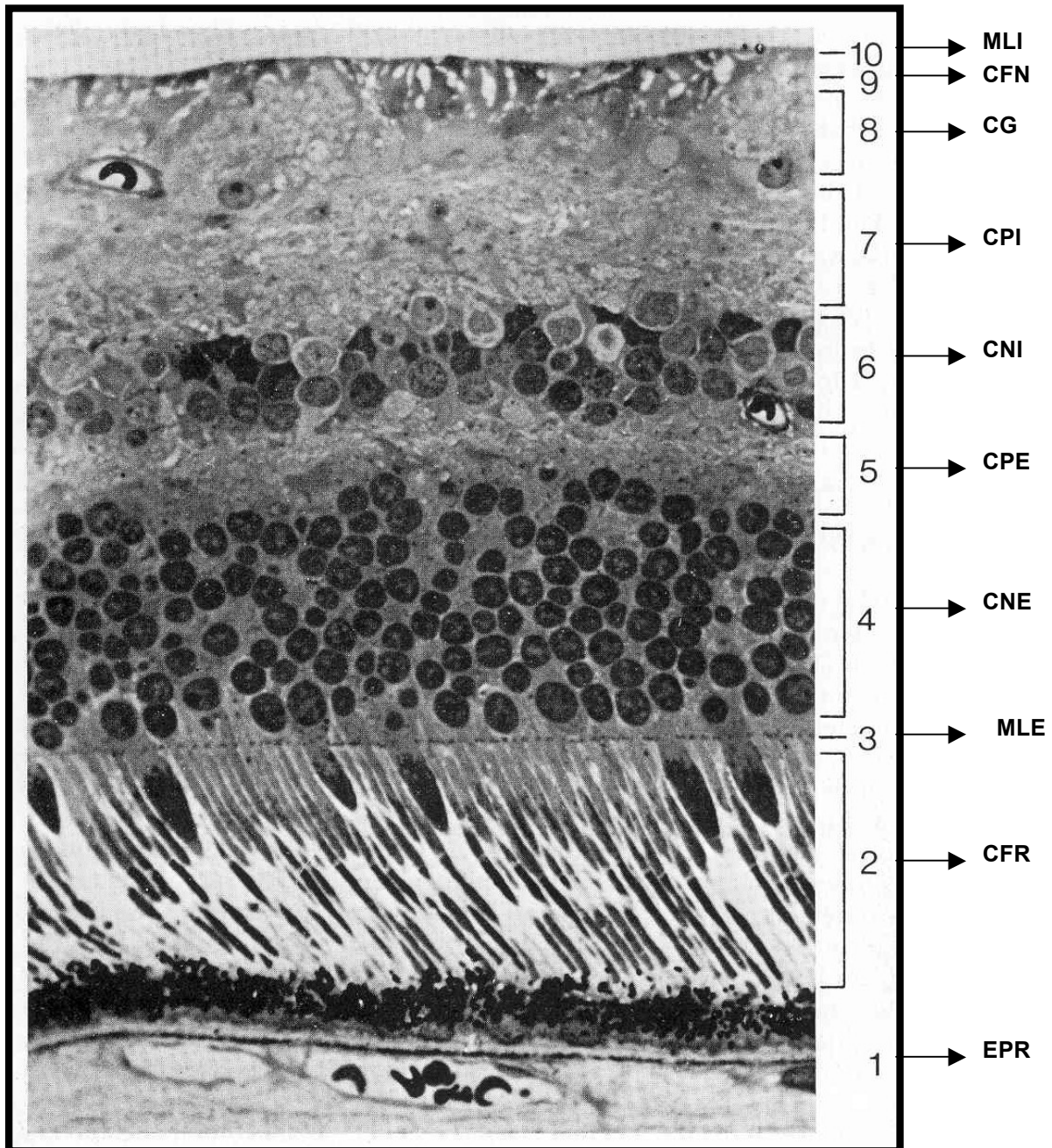
9) A camada de fibras nervosas (CFN) é constituída por axônios das células ganglionares, cercados de prolongamentos das células de Müller, as quais têm papel nutritivo e de suporte para o tecido retiniano. Os axônios das células ganglionares são fibras amielínicas distribuídas em feixes que se estendem paralelamente à superfície da retina e convergem na região papilar, formando o nervo óptico.

10) A membrana limitante interna (MLI), situada entre a retina e o vítreo, representa o limite interno da retina.

Em relação ao suprimento sanguíneo retiniano, a retina humana é suprida, basicamente, por duas redes capilares: os vasos retinianos (a artéria central da retina e seus ramos), que estão localizados na retina interna e fornecem circulação para os dois terços internos da retina e a coriocapilar (sistema capilar de artérias da coróide, ramo

das artérias ciliares), que supre as necessidades metabólicas da retina externa, avascular. Ocasionalmente, uma artéria ciliarretiniana, ramo da circulação ciliar, irá fornecer circulação para a porção da retina interna entre o nervo óptico e o centro da mácula: feixe papilomacular (HOGAN et al, 1971). A artéria retiniana se divide em um ou mais ramos nasais e temporais, que saem do centro do disco óptico. As veias mostram padrão macroscópico semelhante.





**Figura 1.** Estrutura microscópica da retina, ilustrando suas 10 camadas (HOGAN et al., 1971). EPR-epitélío pigmentado da retina; CFR-camada de fotorreceptores; MLE- membrana limitante externa; CNE-camada nuclear externa; CPE-camada plexiforme externa; CNI-camada nuclear interna; CPI-camada plexiforme interna; CG-camada de células ganglionares; CFN-camada de fibras nervosas; MLI-membrana limitante interna

## 1.2 Angiogênese

A formação de vasos sanguíneos envolve dois processos fundamentais: vasculogênese e angiogênese.

A vasculogênese é a formação de vasos sanguíneos a partir dos precursores da célula endotelial, os angioblastos, durante o desenvolvimento embrionário. É caracterizada pela diferenciação e proliferação dos angioblastos, que se organizam numa rede vascular primitiva, denominada plexo capilar primário, a partir do qual novos brotos capilares podem germinar, constituindo a base do processo angiogênico (CONWAY et al., 2001).

A angiogênese é definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes, podendo ocorrer por brotamento ou por intussuscepção, em um processo no qual os vasos são progressivamente remodelados para um sistema circulatório adulto funcional (RISAU, 1997). A angiogênese normal ocorre, mormente, durante o desenvolvimento embrionário. É observada, porém, ao longo da vida adulta, em alguns eventos fisiológicos, sendo essencial para o processo de reprodução, desenvolvimento e reparação. Nessas condições, é ativada por um curto período, sendo, a seguir, completamente inibida (CAMPOCHIARO, 2000).

O controle da angiogênese é feito por um delicado balanço entre fatores endógenos promotores e inibidores. Assim sendo, quando os fatores promotores predominam, a célula endotelial é ativada, proliferando e migrando. Em contrapartida, quando prevalecem os inibidores, a célula endotelial retorna ao estado quiescente, assim, mantendo-se. A ativação da célula endotelial pode envolver tanto a indução de um fator promotor quanto à perda de um inibidor. São exemplos de promotores: VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), FGF2 (*Basic Fibroblast Growth Factor*),

angiopietinas, ICAM 1 (*Intracellular Adhesion Molecule*) e de inibidores: PEDF (*Pigment Epithelial-Derived Factor*), Tryptophanyl-tRNA synthetase, *interferon alpha* e Trombospodina 1 (DORREL et al., 2007; FOLKMAN & D'AMORE, 1996; FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987).

A angiogênese constitui, portanto, complexo processo que inclui mediadores solúveis, interações entre células e da célula com a matriz extracelular, bem como forças biomecânicas. Compreende diversas etapas que, de forma simplificada, podem ser assim descritas: a) aumento da permeabilidade vascular e deposição de fibrina extravascular; b) desarranjo da parede vascular, com remoção dos pericitos; c) degradação da membrana basal e da matriz extracelular; d) migração da célula endotelial, através da matriz extracelular remodelada; e) proliferação da célula endotelial; f) formação de estruturas tubulares; g) inibição da proliferação e migração da célula endotelial; h) reconstituição da membrana basal; i) maturação dos complexos juncionais; j) construção da parede vascular, através do recrutamento e diferenciação de células murais - pericitos e células de músculo liso e, finalmente, estabelecimento de fluxo sanguíneo no novo vaso (BATTEGAY, 1995; CONWAY et al., 2001; PEPPER, 1997; RISAU, 1997).

O sistema vascular retiniano começa no nervo óptico e se estende radialmente em direção à retina anterior (GARIANO & GARDNER, 2005). Vasos da camada superficial retiniana proliferam e invadem a retina interna para formar a rede capilar profunda, através da angiogênese por brotamento, que é o mecanismo predominante de vascularização na retina assim como no cérebro, embora a intussuscepção não esteja excluída (GARIANO & GARDNER, 2005). Uma vez formadas as redes

vasculares, essas são remodeladas, baseadas na tensão de oxigênio tecidual (ASHTON,1957), envolvendo genes regulados pela hipóxia, podendo resultar em regressão vascular, na formação de colaterais ou em neovascularização, como na retinopatia da prematuridade (CHEN & SMITH, 2007).

### **1.2.1 Angiogênese patológica**

Quando os mecanismos de controle são insuficientes, a angiogênese, seja excessiva ou deficiente, torna-se patológica, dando origem, então, às chamadas doenças angiogênese-dependentes. Dentre os processos associados à angiogênese patológica, pode-se citar o crescimento tumoral, artrite reumatóide, formas de retinopatia (STEPHAN & BROCK, 1996), como a retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, retinopatia da prematuridade e oclusão venosa retiniana, glaucoma neovascular e neovascularização corneana. Outras doenças decorrem, por outro lado, da angiogênese insuficiente. Dentre elas: úlceras cutâneas crônicas, isquemia cerebral, miocárdica e periférica (BAUER et al., 2005; HAYASHI et al., 2006; WANG et al., 2006).

A arquitetura única da retina permite identificar dois tipos de neovascularização: a neovascularização retiniana, que usualmente penetra na MLI e progride em direção ao vítreo, embora possa penetrar a retina avascular externa até o espaço sub-retiniano (YANNUZZI et al., 2001); e a neovascularização coróide, que penetra na membrana de Bruch e cresce em direção ao espaço sub-retiniano. Várias observações clínicas e experimentais têm indicado que a isquemia, com conseqüente hipóxia, é o estímulo inicial para a neovascularização retiniana (MICHAELSON, 1948; ASHTON, 1957), por

causar a liberação de fatores angiogênicos (CAMPOCHIARO, 2000; DAS & McGUIRE, 2003).

Assim sendo, grande esforço tem sido empregado no intuito de desvendar os mecanismos envolvidos no processo angiogênico, bem como para a descoberta de drogas que tenham como alvo tais mecanismos, e que possam ser incorporadas ao arsenal terapêutico das doenças angiogênese-dependentes.

### **I.2.2 Fatores angiogênicos**

Conforme anteriormente mencionado, as hipóteses iniciais de Michaelson (1948), Ashton et al. (1954) e Wise (1956) postulam que o desenvolvimento da neovascularização retiniana é estimulado por um ou mais fatores angiogênicos liberados pela retina isquêmica. Na cascata angiogênica retiniana, a hipóxia é o estímulo inicial que causa a liberação dos fatores de crescimento, integrinas e proteinases, o que resulta na proliferação celular endotelial, migração e formação de tubo, passos críticos do processo angiogênico (AUSPRUNK & FOLKMAN, 1977).

A indução da angiogênese foi inicialmente atribuída ao fator de crescimento fibroblástico (FGF) ácido ou básico. Subseqüentemente, muitas outras moléculas foram identificadas como angiogênicas, incluindo: fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento transformante beta ( $TGF-\beta$ ), fator de crescimento transformante alfa ( $TGF-\alpha$ ), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), angiogenina, angiotropina, angiopoietinas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), trombospondina, proteína quinase C fração  $\beta$  ( $PKC-\beta$ ), peptídeos vasoativos, tais como a angiotensina II, e moléculas de adesão, tais como as integrinas (FOLKMAN

& D'AMORE, 1996; FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987), portanto, vários fatores estão envolvidos nesse processo, sendo implicados na neovascularização em diversas doenças retinianas isquêmicas, a exemplo da retinopatia diabética, na qual o VEGF é o principal fator angiogênico (CONNOLLY et al., 1989; SHWEIKI et al., 1992; SHWEIKI et al., 1993).

As angiopoietinas (Ang-1 à Ang-4) têm sido apresentadas como fatores de crescimento específicos para células endoteliais, agindo como associados importantes do VEGF. Elas se ligam a receptores transmembrânicos, tipo tirosina quinase, chamados Tie2, restritos às células endoteliais. Porém, enquanto as Ang-1 e Ang-4 foram identificadas como ativadores desses receptores, Ang-2 e Ang-3 parecem inibir sua atividade (TSIGKOS et al., 2003).

A família dos FGFs compreende 22 membros de estrutura homóloga, apresentando-se como pequenos polipeptídeos com cerca de 18 KDa, não glicosilados, com núcleo central contendo 140 aminoácidos. FGF1 (ácido) e FGF2 (básico) estão preferencialmente implicados no processo da angiogênese. Eles transmitem seus sinais através de 4 receptores de FGF de alta afinidade, proteínas quinases transmembrânicas (FGFR-1 ao FGFR-4), as quais se ligam à FGFs distintos com diferentes afinidades. Essas moléculas atuam como reservatório para fatores pró-angiogênicos e são sintetizadas por uma variedade de tipos celulares, incluindo células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos da derme, promovendo a proliferação e diferenciação celular (PRESTA et al., 2005).

O TGF- $\beta$  é um dos mais importantes moduladores da angiogênese, apresentando-se em três isoformas nos mamíferos (TGF-( 1, 2 e 3). Essas isoformas alcançam

suas ações biológicas por meio de ligação a receptores de superfície (TGF-(Rs), designados tipos I, II e III, sendo estimuladores da mitose ou inibidores da proliferação (PEPPER, 1997).

Os IGF-I e II são potentes estimuladores da mitose e têm efeito benéfico no processo da cicatrização. O IGF-I também aumenta a expressão do mRNA VEGF e a produção do VEGF em osteoblastos (GOAD et al., 1996) e em linhas celulares do carcinoma de cólon (WARREN et al., 1996). Além disso, níveis elevados de IGF-I são encontrados no vítreo de pacientes com retinopatia diabética proliferativa (PFEIFFER et al., 1997).

O PDGF, que compreende uma família de proteínas homo ou heterodiméricas, foi o primeiro fator de crescimento a se apresentar como quimiotático de células inflamatórias e promotor de proliferação celular (TALLQUIST & KAZLAUKAS, 2004).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos agentes angiogênicos mais amplamente estudados, tendo papel essencial no desenvolvimento vascular, angiogênese e linfangiogênese (IKEDA et al., 2006). A identificação, caracterização e purificação do VEGF, em 1989, por Leung et al, contribuíram para o entendimento da regulação da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo na angiogênese.

### **1.2.3 Fator de crescimento vasoendotelial (VEGF)**

O VEGF, glicoproteína de 45-KDa, é um mitógeno celular endotelial angiogênico *in vivo* e potente indutor de permeabilidade microvascular (CONNOLLY et al., 1989; DVORAK et al., 1995). A família dos fatores de crescimento endotelial inclui o fator de crescimento placentário (PIGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o homólogo do VEGF viral VEGF-E (WITMER et al., 2003; WERNER & GROSE, 2003). Nos humanos,

quatro isoformas de VEGF-A foram identificadas, com variação no número de aminoácidos, sendo elas os VEGF 121, 165, 189 e 206 (WITMER et al, 2003), as quais possuem atividades biológicas similares, mas diferem em suas propriedades de ligação ao heparan-sulfato e à matriz extracelular.

Muitos tipos celulares são capazes de produzir VEGF, como os fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e queratinócitos. Na retina, o VEGF tem sua expressão aumentada pela hipóxia em células gliais, como células de Müller e astrócitos de retinas de ratos (SUEISHI et al., 1996), e em pericitos, células endoteliais e células do EPR humanas cultivadas (SHIMA et al., 1995; AIELLO et al., 1995). Em pacientes diabéticos, o VEGF foi identificado nas células de Müller e células gliais na porção anterior do nervo óptico (AMIN et al., 1997). Fibroblastos da coróide também podem apresentar expressão do RNA mensageiro do VEGF aumentada, secundária à estimulação parácrina (KVANTA, 1995).

As isoformas do VEGF A são geradas por *splicing* alternativo do RNA mensageiro (PLATE & WARNKE, 1997). As formas mais longas (com maior número de aminoácidos: 189 e 206) encontram-se ligadas à matriz extracelular e as mais curtas (isoformas 121, 165) livremente difusíveis. VEGF-A está envolvido nos processos de aumento da permeabilidade vascular e angiogênese, sendo 5 000 vezes mais potente que a histamina (SENGER et al., 1990). VEGF-B está envolvido na progressão de tumores por mecanismos não angiogênicos, como a proteólise (Gunningham et al., 2001), enquanto que VEGF-C e VEGF-D estão envolvidos na angiogênese e linfangiogênese também de tumores. Segundo Namiecinska et al. (2005), os VEGF A e B têm maior participação na angiogênese, enquanto os VEGF C e D, na



linfangiogênese. O VEGF A age também aumentando a permeabilidade vascular. Além de sua ação como fator chave na angiogênese, o VEGF-A também possui atividade neurotrófica e neuroprotetora, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico (NAMIECINSKA et al., 2005). O VEGF E descrito mais recentemente também é potente fator angiogênico (MEYER et al., 1999).

Três receptores tirosinaquinase, KDR (VEGFR-2), Flt-1 (VEGFR-1) e Flt-4 (VEGFR-3), medeiam a atividade do VEGF, enquanto dois outros receptores sem atividade tirosinaquinase, as neuropilinas, também são importante sítios de ligação do VEGF (CAMPOCHIARO, 2004). O VEGFR-1 é receptor para os VEGF A e B, o VEGFR-2 para VEGF A, C, D e E, e o VEGFR-3 é receptor para os VEGF C e D (WITMER et al., 2003). Em processos patológicos, a produção de VEGF e seus receptores está relacionada à hipóxia tecidual, compartilhando possivelmente um fator comum, HIF (fator induzido pela hipóxia), que se acumula quando há baixo teor de oxigênio e desencadeia a ativação de grande número de genes, inclusive o responsável pelo VEGF (ARJAMAA & NIKINMAA, 2006). A hipóxia estimula a expressão do mRNA VEGF-A (SHWEIKI et al., 1992), enquanto os mRNA VEGF C e VEGF D têm sua expressão diminuída (IKEDA et al., 2006). O aumento do VEGF A resulta em estímulo à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, proliferação das células endoteliais e ativação das metaloproteinases que lisam a matriz extracelular, deixando espaço para o crescimento de um novo vaso (OLIVEIRA et al., 2002).

### 1.3 Doenças vasculares da retina

As doenças vasculares da retina, por seu caráter crônico e progressivo e por serem relativamente intratáveis, são uma das principais causas de cegueira da humanidade. Dentre elas, destacam-se a retinopatia diabética, oclusões venosas retinianas (oclusão de veia central da retina e oclusões de ramo da veia central da retina), retinopatia da prematuridade e degeneração macular relacionada à idade (MILLER, 1997). A patogênese em comum dessas doenças é o comprometimento do suprimento sanguíneo do tecido retiniano, levando à isquemia do mesmo. Como comentado acima, a isquemia induz a produção de diversos fatores, dentre eles o VEGF e, conseqüentemente, estimula a angiogênese. Novos vasos surgem na retina ou na coróide (DMRI) e, pelas características imaturas de suas paredes, sangram, perdem líquido, proteína e gorduras pelas suas paredes, e levam a hemorragias e acúmulo desses constituintes sanguíneos no interstício da retina. As células sofrem com a isquemia e alteração do interstício da retina, culminado com a apoptose ou necrose das mesmas (MARTIN et al., 2004). Os neovasos de retina podem crescer sobre o vítreo, formando pontes fibrovasculares que, posteriormente, podem contrair e ocasionar hemorragias e descolamento de retina tracional, caracterizando estágios avançados das retinopatias vasculares (AIELLO et al., 1998; GARNER, 1981; KOHNER, 1993; PORTA & BANDELLO, 2002).

## 1.4. Retinopatia diabética

A retinopatia diabética é o conjunto de alterações crônicas que ocorrem na retina decorrentes do *diabetes mellitus* e foi descrita inicialmente por Jaeger, em 1885 (von JAEGER, 1855). As anormalidades eram atribuídas à hipertensão arterial sistêmica, freqüentemente coexistente com o diabetes, ou a uma resposta inflamatória aos níveis elevados de albumina e uréia, daí o termo *retinite diabética*. A descoberta da insulina por Banting e Best, em 1921 (BANTING & BEST, 1922), revolucionou o tratamento do diabetes e levou ao aumento da longevidade, proporcionando tempo para o desenvolvimento das complicações tardias como a retinopatia. A cegueira pelo diabetes, assim, se tornou crescente problema de saúde pública, até então sem tratamento eficaz. Sua trágica história natural foi bem descrita por Beetham (BEETHAM, 1963) e Caird (CAIRD & GARRET, 1963), em 1963. Surgiram, dessa forma, algumas tentativas de se controlar a doença como a ablação parcial da hipófise (PANISSET et al., 1971) e a ingestão diária de aspirina (KOHNER, 2003), porém, nenhum tratamento se mostrou prático e eficaz até o advento da fotocoagulação a LASER (BEETHAM et al., 1970), como comentado na sessão de tratamento apresentada a seguir.

### 1.4.1 Epidemiologia

A retinopatia diabética constitui grave problema de saúde pública por sua elevada prevalência. Nos Estados Unidos da América (EUA), aproximadamente 8% dos casos de cegueira legal são atribuídos ao diabetes, sendo a retinopatia diabética a principal causa de novos casos de cegueira em indivíduos entre 20 e 74 anos de idade (*National Society to Prevent Blindness*, 1980). Entre diabéticos do tipo 1, com 30 anos

ou mais de doença, aproximadamente 12% são cegos. Além do desastroso impacto social há elevado custo financeiro que, nos EUA, é estimado em 500 milhões de dólares anualmente (CHIANG et al., 1992). A prevalência da retinopatia aumenta com o aumento da idade, chegando ao máximo em pacientes entre 65 e 74 anos, havendo declínio a partir dessa idade, possivelmente atribuído à maior taxa de mortalidade em diabéticos idosos com outras lesões em órgãos alvo.

O *Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy* (WESDR) (KLEIN et al., 1982; KLEIN et al., 1984a,b) é um estudo epidemiológico para se determinar a progressão da retinopatia diabética. O estudo incluiu, de 1979 a 1980, dois grupos distintos de pacientes: grupo de início precoce (n=1210), usuários de insulina, diagnosticados como diabéticos com menos de 30 anos e o grupo de início tardio constituído (n=1780) por pacientes diagnosticados com 30 anos ou mais de idade. Durante os anos subsequentes, notou-se aumento da prevalência da retinopatia diabética com aumento da duração da doença: após 20 anos de diabetes, aproximadamente 99% dos pacientes do grupo de início precoce e 60% dos pacientes do grupo de início tardio tinham alguma forma de retinopatia, e 3,6% dos pacientes do primeiro grupo e 1,6% dos pacientes do segundo grupo eram legalmente cegos (KLEIN et al, 1984a,b).

Em outro estudo, realizado em Poole, Inglaterra, 2% dos 449 pacientes não insulínicos e 1% dos 212 insulínicos eram legalmente cegos (HOUSTON, 1982). Também, na Inglaterra, em Oxford, 1982, outro estudo populacional revelou que 28% dos pacientes com idade maior ou igual que 60 anos e diabéticos do tipo 2 tinham comprometimento visual (COHEN et al., 1991). Em um

estudo dinamarquês, 3,4% dos homens e 2,6% das mulheres com diabetes, diagnosticados, com idade menor que 30 anos, tinham cegueira legal (SJOLLIE & GEENE, 1987).

No Brasil, as estatísticas sobre retinopatia diabética são escassas. HIRATA et al. (1986) relataram presença de retinopatia diabética em 43,48% (9,42% de retinopatia proliferativa) dos pacientes do ambulatório de Diabetes da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo que 26,5% não tinham conhecimento da doença na retina. Ulson e Abujamra (1986) observaram que, dos 400 pacientes com retinopatia diabética, avaliados em uma clínica oftalmológica particular em São Paulo, 42% apresentavam retinopatia diabética não proliferativa e 58% a forma proliferativa. Fernandez et al. (1998) encontraram 41,7% de retinopatia entre pacientes do tipo 1 e 33,9% de retinopatia entre diabéticos do tipo 2, no ambulatório da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. Da mesma maneira, Steck et al. (1993) encontraram prevalência de 71,43% em pacientes insulíndependentes em contraposição a 64,52% dos não insulíndependentes, em ambulatório do Hospital das Clínicas de Franco da Rocha. Em população atendida pelo SUS de Londrina, Estado do Paraná, Casella et al. (1994) encontraram prevalência de 29,7% de retinopatia diabética.

Em Ribeirão Preto, SP, foram realizados dois importantes estudos epidemiológicos sobre a prevalência da retinopatia diabética. No primeiro estudo, de Souza Jr (2003), foram examinados 2303 pacientes diabéticos no Mutirão do “Olho Diabético”, um programa do Governo Federal, especialmente designado para melhorar a assistência aos pacientes com problema retiniano causado pelo diabetes. A frequência de retinopatia diabética foi 28%. As taxas de ocorrência de cegueira legal

foram 19% nos pacientes do tipo 1 e 13% nos pacientes do tipo 2. O segundo estudo sobre a prevalência da retinopatia diabética em Ribeirão Preto, realizado por Alves (ALVES, 2004), teve como principal característica a utilização do planejamento amostral de um estudo prévio (TORQUATO et al., 2003), no qual foi estudada a prevalência do diabetes na população adulta de Ribeirão Preto. Torquato et al. (2003) partiram de uma amostra de 1473 indivíduos representativos da população adulta de Ribeirão Preto e encontraram 178 diabéticos (12,1%). Desses, 132 (74,16%) foram incluídos no trabalho de Alves, evidenciando-se uma prevalência de retinopatia diabética na população adulta urbana de Ribeirão Preto de 12%. Em relação à cegueira legal, 17,42% dos 132 pacientes incluíam-se nessa categoria, sendo 5,3% devido à retinopatia diabética.

#### **1.4.2 Fisiopatogenia**

A alteração patológica inicial, relacionada à retinopatia diabética é o espessamento da membrana basal dos capilares da retina. Outra alteração pré-clínica da retinopatia diabética é a perda dos pericitos desses mesmos capilares. Ambas as alterações podem se relacionar ao acúmulo excessivo de sorbitol intracelular, que é produto da degradação da glicose pela enzima aldose redutase (AKAGI et al., 1983; DAS et al., 1990; ROBISON et al., 1983; ROBISON et al., 1986).

Na reação bioquímica, onde o sorbitol é degradado pela enzima sorbitol desidrogenase, a frutose é lenta. Na presença de quantidade excessiva de glicose, o nível de sorbitol tende a aumentar e tornar-se tóxico, como já demonstrado para o epitélio do cristalino (TAKAMURA et al., 2003). Não se sabe claramente o mecanismo

pelo qual o excesso de sorbitol afeta a membrana basal dos capilares, porém, cães com galactosemia, doença que culmina com acúmulo intracelular de outro subproduto do metabolismo das hexoses, o galactiol (semelhante ao sorbitol), possuem espessamento da membrana basal dos capilares da retina e perda de pericitos (ROBISON et al., 1983, FRANK et al., 1983).

Uma outra corrente de investigação postula que as alterações na membrana basal decorram da glicosilação do colágeno da mesma, devido ao excesso de glicose circulante (DAS et al., 1990). Além da via do sorbitol, Xia et al. (1994) propuseram uma via bioquímica diferente para explicar a lesão capilar decorrente da hiperglicemia. Segundo esses autores, o diabetes em alguns meses leva ao aumento do diacilglicerol (DAG) nas células da retina de cachorros. Níveis elevados de DAG estimulam a atividade da proteína kinase C (PKC), enzima que também é ativada pela ligação do VEGF ao seu receptor na superfície celular, sendo responsável pelos efeitos desse fator sobre o aumento da permeabilidade vascular e proliferação neovascular na retina.

A teoria de Xia et al. é controversa, pois os inibidores da PKC não têm apresentado resultados clínicos significativos em termos de prevenção do avanço da retinopatia diabética em humanos (MILTON et al., 2003), apesar de um pequeno estudo ter mostrado algum benefício para edema macular (CAMPOCHIARO & C99-PKC 412-003 *Study Group*, 2004).

Baseando-se nas hipóteses fisiopatológicas acima, pressupõe-se que o controle da glicemia seja a melhor maneira de retardar a progressão da retinopatia diabética. De fato, o *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT), um estudo clínico multicêntrico, demonstrou, de forma clara, que o controle adequado da glicemia é o

mais importante na prevenção e/ou na diminuição da velocidade de progressão da retinopatia (DCCT *Research Group*, 1993). Outros fatores relacionados à gravidade do acometimento retiniano incluem tempo de doença, níveis de hemoglobina glicosilada, níveis de pressão arterial sistêmica e tabagismo (DCCT *Research Group*, 1993; MULHAUSER et al., 1986; UKPDS, 1998).

A primeira manifestação clínica da retinopatia diabética é o microaneurisma, pois o espessamento da membrana basal e a perda de pericitos dos capilares não são detectáveis clinicamente. Existem duas teorias para a formação dos mesmos: a primeira postula que os microaneurismas decorram da proliferação focal de células endoteliais, que perderam o estímulo inibitório (antiproliferação), proveniente dos pericitos (LINDAHL et al., 1997); a segunda teoria seria que o microaneurisma decorra de fragilidades focais da parede vascular pela perda dos pericitos.

As alterações patológicas acima mencionadas são a base da microangiopatia diabética que afeta arteríolas pré-capilares, capilares e vênulas retinianas. Contudo, vasos maiores podem também estar envolvidos (KOHNER, 1993). Os aspectos da microangiopatia incluem tanto lesões decorrentes da oclusão (manchas algodinosas) ou ruptura da microvasculatura da retina (hemorragias), como do extravasamento de constituintes plasmáticos por sua parede alterada (edema e exsudatos duros). Em longo prazo, o comprometimento da microcirculação gera áreas de retina com má ou ausente perfusão capilar (identificáveis pelo estudo de angiofluoresceinografia), cujas células passam a produzir fatores angiogênicos, dentre eles o VEGF. Em decorrência da hipóxia e conseqüente estímulo pelo VEGF, desenvolvem-se: 1) os *shunts* arteriovenosos associados a oclusões capilares significativas que seguem das vênulas



para as arteríolas, denominados IRMA (anormalidades microvasculares intra-retinianas); 2) a neovascularização, numa tentativa de revascularizar as áreas hipóxicas da retina.

### **1.4.3 Achados oftalmológicos e classificação**

Como acima mencionado, a presença de microaneurismas nos capilares retinianos é a primeira manifestação detectável ao oftalmoscópio, ainda que as primeiras alterações histopatológicas sejam o espessamento da membrana basal e a perda de pericitos (BLOODWORTH & ENGERMAN, 1973; BLOODWORTH & MOLITOR, 1965). Inicialmente, a maior parte dos microaneurismas situa-se no lado venoso dos capilares e, mais tardiamente, surgem no lado arterial dos mesmos (GARNER, 1981). Devido à sua permeabilidade, ocorre acúmulo de água, proteínas e lipídios no tecido retiniano. O líquido que sai dos capilares leva ao espessamento da retina, principal característica clínica do edema macular. As proteínas e os lipídeos podem se acumular no interstício da retina e gerar os exsudatos duros. Quando há ruptura dos microaneurismas, surgem hemorragias intra-retinianas. Se essa hemorragia é profunda (posterior à camada nuclear interna) tem forma oval ou redonda. As hemorragias mais superficiais (camada de fibras nervosas) assumem o padrão de chama de vela, indistinguíveis daquelas ocorridas na retinopatia hipertensiva, ou oclusões venosas da retina (AIELLO et al., 1998; GARNER, 1981; KOHNER, 1993).

Com a agressão crônica da microcirculação da retina, aparecem sinais de hipóxia retiniana, incluindo-se hemorragias múltiplas, manchas algodinosas, IRMA e

aumento da tortuosidade venosa. As manchas algodinosas são causadas por oclusão das arteríolas pré-capilares, levando a infartos nas camadas de fibras nervosas. As anormalidades microvasculares intra-retinianas, hemorragias retinianas e/ou microaneurismas múltiplos e alterações venosas (*venous beading*: veias em rosário) são os fatores mais importantes para previsão de progressão da retinopatia. Quando essa progressão ocorre, há desenvolvimento de neovascularização de retina, característica da retinopatia proliferativa (ETDRS *Research Group*, 1991b).

A retinopatia proliferativa caracteriza-se pela presença de neovasos, que geralmente, se originam de vênulas. Quando estão a menos de 1mm do disco óptico, ou se originam do mesmo, são denominados neovasos de disco (NVD). Quando estão situados a mais de 1mm do disco óptico recebem outra denominação: neovasos extradisciais (NVE). Os NVE quase sempre crescem em direção ou estão situados em áreas retinianas de não perfusão capilar. No entanto, a não perfusão capilar é mais abundante em olhos com NVD do que com NVE (SHIMUZU et al., 1981).

De maneira geral, os neovasos tendem a crescer ao longo das áreas de menor resistência, o que explica a sua grande presença no disco óptico, devido à ausência de membrana limitante interna verdadeira. Associada aos neovasos, ocorre a formação de tecido conectivo, levando ao aparecimento de tecido fibrótico que pode ser vascular ou avascular. A variedade fibrovascular está geralmente relacionada com vasos que se estendem para dentro da cavidade vítrea ou com neovasos na superfície da retina ou do disco. A variedade avascular geralmente resulta no espessamento da face posterior da hialóide (McMEEL, 1971). Após o desenvolvimento das alterações fibrovasculares, contrações vítreas súbitas podem levar à ruptura dos neovasos causando hemorragia

vítrea. Contudo, de 62 a 83% das hemorragias vítreas diabéticas ocorrem durante o sono (ANDERSON, 1980; TASMAN, 1979). Isso talvez se explique pelo aumento da pressão arterial secundário à hipoglicemia matinal, ou devido ao movimento rápido dos olhos (REM, *rapid eye movement*), durante o sono. Devido ao fato de poucas hemorragias ocorrerem durante o exercício não há restrição da atividade física dos pacientes com retinopatia diabética proliferativa. A contração do tecido fibrovascular, ancorado no vítreo posterior, também pode levar ao descolamento tracional da retina (AIELLO et al., 1998; GARNER, 1981; KOHNER, 1993; PORTA & BANDELLO, 2002), caracterizando o estágio mais avançado da retinopatia diabética, como apresentado na classificação abaixo (*The Diabetic Retinopathy Study Research Group, 1979, 1981b; ETDRS Research Group, 1991b,c*):

**Retinopatia diabética não proliferativa: mínima** - microaneurismas somente; leve - microaneurismas mais hemorragias retinianas, exsudatos duros; **moderada** - achados da retinopatia leve, acrescidos de manchas algodinosas e/ou IRMA; **grave** - presença de uma das seguintes características: microaneurismas mais veias em rosário e/ou hemorragias/microaneurismas maior ou igual à fotografia padrão 2A (Figura 2) em quatro quadrantes, ou veias em rosários notórias em dois ou mais quadrantes, ou IRMA moderada (fotografia padrão 8A – Figura 3) em um ou mais quadrantes; **muito grave** - duas ou mais das características acima descritas na forma grave.



Figura 2. Fotografia padrão 2A: Hemorragias intra-retinianas e microaneurismas difusos em retinopatia diabética não proliferativa (*Diabetic Retinopathy Study Research Group, 1981b*).



Figura 3. Fotografia padrão 8A: IRMA em retinopatia diabética não proliferativa (*Diabetic Retinopathy Study Research Group, 1981b*).

**Retinopatia diabética proliferativa: sem características de alto risco** – é caracterizada pela presença de NVE, neovasos de disco menores que um quarto de diâmetro de disco; hemorragia vítrea ou pré-retiniana, com NVE de menos de meio diâmetro de disco óptico, sem neovasos de disco; **com características de alto risco** - NVD maiores que um quarto de diâmetro de disco (fotografia padrão 10A); NVD associados à hemorragia vítrea ou pré-retiniana; NVE maiores que meio diâmetro de disco associados à hemorragia vítrea ou pré-retiniana; avançada - presença de descolamento de retina tracional, envolvendo a mácula, ou hemorragia vítrea, que impeça a classificação.

## 1.4.4 Tratamento da retinopatia diabética

### 1.4.4.1 Hipofisectomia

Em 1930, Houssay e Biassoti (HOUSSAY & BIASSOTI, 1930) mostraram que a hipofisectomia em cachorros, previamente pancreatectomizados reduzia a gravidade do diabetes desses animais. Vinte e dois anos após, Luft et al. (1952) realizaram uma hipofisectomia em humanos para amenizar as complicações vasculares do diabetes. Mais adiante, Poulsen (1966) reportou a remissão da retinopatia diabética em uma mulher com Síndrome de Sheehan (insuficiência pituitária anterior pós-parto). Nos 25 anos seguintes, vários métodos de supressão pituitária foram utilizados para o tratamento da retinopatia diabética, variando da radioterapia por feixe externo até a hipofisectomia transfrontal. O método foi avaliado prospectivamente e os resultados positivos da hipofisectomia foram publicados por Panisset et al. (1971), que relataram a favorável regressão da retinopatia diabética em pacientes com supressão hipofisária, quando comparados com indivíduos com pouca ou nenhuma supressão. Nos dias de hoje, a supressão hipofisária tem interesse histórico e teórico, pois a fotocoagulação com *LASER* de argônio leva a resultados tão animadores quanto aqueles da hipofisectomia, sem os efeitos colaterais dessa última: lesões do sistema nervoso central, necessidade de reposição hormonal e esterilidade.

O efeito favorável da ablação hipofisária sobre a retinopatia, no entanto, que se pensa decorrer da redução dos níveis de hormônio de crescimento (GH), deixou uma base de investigação para novas terapêuticas que culminem com esse mesmo fim. Baseado nisso, tem se estudado a injeção subcutânea de um antagonista do receptor

de GH, desenvolvido por engenharia gênica, pegvisomant (*Growth hormone antagonist for proliferative diabetic retinopathy study group*, 2001), que reduziu o nível de hormônios relacionados com o GH, sem, no entanto, causar a involução de neovasos de retina. Em outro pequeno estudo randomizado, o uso de octreotide, um análogo da somatostatina que inibe o GH e o fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor*), fez com que pacientes com retinopatia diabética não proliferativa grave, ou retinopatia diabética sem características de alto risco, necessitassem menos de fotocoagulação que o grupo placebo (GRANT et al., 2000). Um estudo clínico fase III, com uso de octreotide mensal intramuscular, está sendo realizado para comprovar o efeito desse fármaco sobre a evolução da retinopatia diabética (DAVIS & BLODI, 2006).

#### **1.4.4.2 Fotocoagulação a LASER**

A possibilidade do uso da luz para o tratamento de doenças retinianas em geral foi aventada a partir da constatação de que a observação de um eclipse solar provocava dano retiniano. Em 10 de julho de 1945, data de ocorrência de um eclipse solar, Meyer-Schwickerath interessou-se em estudar a luz para tratamento de doenças retinianas. A princípio foi tentado a usar luz solar refletida, o que se revelou impraticável. Outras fontes passaram então a ser pesquisadas, tais como a luz de xenônio de alta pressão. Os primeiros tratamentos com tal técnica foram feitos em pequenos rasgos retinianos e lesões suspeitas de melanoma, publicados em 1950 (MEYER-SCHWICKERATH, 1950). Os resultados iniciais do tratamento específico de

retinopatia diabética com luz de xenônio foram desanimadores (OKUN & CIBIS, 1966; WETZIG & JEPSO, 1966; WETZIG & WORLTON, 1963), até que evoluíram para resultados melhores que a história natural da doença (BEETHAM, 1963; CAIRD & GARRET, 1963). Os conceitos iniciais de tratamento da retinopatia diabética eram incertos e variavam desde queimar tudo que fosse vermelho, produzindo, assim, uma linha de coagulação ao longo das arcadas vasculares, até tratamento confluyente de áreas de neovascularização. Durante essa época, cresceu o interesse em usar o *LASER* para o tratamento da RD através de fotocoagulação retiniana (BEETHAM et al., 1969). Campbell e Zweng usaram laser de rubi com sucesso limitado no início de 1960 (CAMPBELL et al., 1963; CAMPBELL et al., 1965; ZWENG, 1964), mas Beetham e Aiello obtiveram mais tarde resultados melhores com a mesma técnica, demonstrando, pela primeira vez, efeito positivo da panfotocoagulação retiniana (AIELLO et al., 1969; BEETHAM et al., 1970). No final de 1960, começou-se a usar o *LASER* de argônio para fotocoagulação retiniana, sendo bons resultados publicados por Patz et al. (1971), Zweng et al. (1971), Peabody et al. (1970) e Little et al. (1970). Os estudos de Davis (DAVIS, 1967, 1968, 1969), acerca da história natural da RD, demonstraram claramente que muitos casos evoluíam espontaneamente para fibrose e resolução do processo neovascular, determinando a busca para que tal resolução fosse atingida através da aplicação de *LASER* em um padrão tal que poupasse a mácula e reduzisse o estímulo para neovascularização retiniana.

A eficácia da fotocoagulação a *LASER* foi primeiramente demonstrada pelo Diabetic Retinopathy Study (*Diabetic Retinopathy Study Research Group*, 1976, 1978, 1979, 1981a,b), criado em 1971 para testar a eficiência da fotocoagulação retiniana no



tratamento da retinopatia diabética. Foi o primeiro ensaio clínico randomizado, multicêntrico, patrocinado pelo recém-formado Instituto Nacional do Olho (National Eye Institute), vinculado ao Instituto Nacional de Saúde (National Institute of Health). Foram avaliados 1742 pacientes com retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) severa ou retinopatia diabética proliferativa (RDP), e acuidade visual de 20/100 ou melhor, em cada olho. Um olho de cada paciente foi randomizado para tratamento com fotocoagulação retiniana com *LASER* de argônio ou xenônio e o outro olho foi apenas observado. O tratamento com fotocoagulação foi randomizado ainda para técnica direta ou panfotocoagulação. Ambas as técnicas incluíam tratamento com queimaduras espaçadas de meia a uma marca de *LASER* entre si, indo do pólo posterior ao equador. O tratamento com *LASER* de argônio consistia de 800 a 1600 queimaduras de 500 $\mu$ m e 0,1s de duração na panfotocoagulação ou de maneira direta a neovasos de disco ou retina, tanto planos como elevados. Tratamento direto também era aplicado aos microaneurismas ou outras lesões consideradas causas do edema macular do paciente. Novas sessões de tratamento eram realizadas em intervalos de 4 meses se necessárias. A técnica com o *LASER* de xenônio era similar, mas as marcas eram menores, de 400 a 800 queimaduras, e com duração maior e tratamento direto não era aplicado a neovasos elevados e neovasos de disco.

Como resultado, observou-se redução de 50% na perda visual grave (definida como  $AV \leq 5/200$  em 2 ou mais visitas consecutivas agendadas com intervalo de 4 meses cada), nos olhos submetidos à fotocoagulação. Além de comprovar a eficácia da fotocoagulação retiniana, o DRS foi importante porque identificou as características de alto risco para perda visual dos olhos com retinopatia diabética: 1) neovascularização

de retina e hemorragia vítrea; 2) neovascularização no disco óptico ou próxima desse mesmo sem hemorragia vítrea. Após 24 meses de seguimento, constatou-se que as taxas de perda visual severa para olhos com características de alto risco foram respectivamente 26% para o grupo controle e 11% no grupo tratado. O estudo mostrou ainda que olhos com retinopatia diabética proliferativa sem características de alto risco apresentavam menor risco de perda visual grave em 2 anos, tanto no grupo controle (7%), quanto no grupo tratado (3%). Os efeitos colaterais foram maiores nos pacientes submetidos a tratamento com *LASER* de xenônio (perda de campo visual, diminuição de 1 ou 2 linhas de acuidade visual, dificuldade de adaptação ao escuro) do que naqueles tratados com *LASER* de argônio.

Apesar da fotocoagulação retiniana ser comprovadamente eficaz em pacientes com RDP de alto risco, como demonstrado pelo DRS, permanecia a dúvida se o tratamento precoce para estágios menos graves da doença traria maiores benefícios. Daí o surgimento do Estudo do Tratamento Precoce da Retinopatia Diabética (ETDRS), desenhado com o intuito de responder à questão do tratamento precoce e também a questões sobre o edema macular e sobre o uso de aspirina para pacientes com retinopatia.

Foram incluídos no estudo 3711 pacientes portadores de RDNP leve a moderada e RDP sem características de alto risco, com ou sem edema macular, selecionados no período de abril de 1980 a agosto de 1985. Foram excluídos pacientes portadores de RDP de alto risco, pacientes com acuidade visual menor que 20/200, e outras doenças oculares graves. Comparado ao DRS, os pacientes incluídos no

ETDRS eram mais velhos (52% acima de 52 anos) e predominantemente homens (56%).

Todos os pacientes do ETDRS foram randomizados para receberem 650mg de aspirina por dia, ou placebo, para avaliar se o efeito antiplaquetário da mesma afetaria a microcirculação retiniana e retardaria a evolução da RDP. Como resultado, observou-se que a aspirina não afetou a progressão da retinopatia diabética ou o risco de perda visual. Surpreendentemente, também, não aumentou o risco de hemorragia vítrea em pacientes com RDP. Em contrapartida, o uso de aspirina foi associado à redução de 17% na morbimortalidade por doença cardiovascular, justificando, portanto, o seu uso em pacientes com tal condição. A RDP não contra-indica o uso de aspirina.

Com relação à fotocoagulação retiniana, um olho de cada paciente foi randomizado para fotocoagulação imediata, enquanto o outro seria apenas observado. O olho observado seria tratado caso a retinopatia diabética progredisse e passasse a apresentar características de alto risco. Se o olho designado para panfotocoagulação apresentasse edema macular, o tratamento do edema macular era realizado previamente com aplicação de *LASER* focal em áreas de microaneurismas (tratamento direto), ou em grade (*grid*) em áreas de vazamento difuso (tratamento indireto). A comparação entre fotocoagulação precoce e observação mostrou discreta redução na incidência de perda visual grave nos olhos tratados. Entretanto, as taxas de perda visual grave em 5 anos foram similares nos 2 grupos. Em olhos com retinopatia diabética leve a moderada, cujas taxas de progressão para perda visual grave foram ainda menores, os efeitos colaterais inerentes ao tratamento não justificavam o início do tratamento precoce com fotocoagulação a *LASER*. Por outro lado, em olhos com

RDNP grave ou retinopatia diabética proliferativa, o risco do tratamento precoce era justificado e o tratamento recomendado antes do surgimento de características de alto risco (*ETDRS Research Group*, 1991a).

Os resultados do ETDRS também forneceram dados importantes para o manuseio do edema macular diabético (*ETDRS Research Group*, 1985). De acordo com o estudo o tratamento com *LASER* focal ou *grid* reduziu o risco de perda visual moderada secundária ao edema macular em 50%. Estabeleceu-se, ainda, que nem todos os olhos com edema macular deveriam ser imediatamente tratados. Os olhos com edema macular que se beneficiariam do tratamento precoce seriam aqueles cujo edema ameaçasse o centro da mácula, tendo sido esse edema chamado “edema macular clinicamente significativo”: 1) espessamento retiniano dentro de 500 $\mu$ m do centro da mácula, ou 2) exsudatos duros dentro de 500 $\mu$ m do centro da mácula, associados a espessamento retiniano adjacente ou 3) área de espessamento retiniano de 1DD e qualquer porção dessa área a 1DD do centro da mácula.

#### **1.4.4.3 Vitrectomia via *pars plana***

No começo dos anos 60, coincidentemente com o desenvolvimento da fotocoagulação, uma cirurgia revolucionária era desenvolvida no *Bascom Palmer Eye Institute*: a vitrectomia. David Kasner foi o primeiro a obter sucesso em termos de preservação visual em um olho traumatizado, após a remoção do vítreo opacificado (BLANKENSHIP, 2000). Robert Machemer, também do BPEI, intrigado com a experiência inicial do Dr. Kasner, e contando com o apoio do então diretor do BPEI, Edward WD Norton, começou um programa de pesquisa para se entender a

patofisiologia das doenças do vítreo, que culminou com o desenvolvimento de microinstrumentos cirúrgicos e procedimentos com os quais era possível a remoção segura do vítreo, enquanto a pressão intra-ocular era mantida, assim como o globo ocular formado (MACHEMER, 1974; MACHEMER et al., 1971, 1972).

Em 1968, após o Simpósio sobre Tratamento da Retinopatia Diabética, que aconteceu na Airlie House em Warrenton, Estado da Virgínia, o National Eye Institute (NEI) convidou Mathew Davis, do Departamento de Oftalmologia da Escola de Medicina da Universidade de Wisconsin, para ser o Chefe do Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study (DRVS). Esse estudo clínico randomizado demonstrou que a conduta convencional (postergar a vitrectomia via *pars plana* por um ano em pacientes com hemorragia vítrea densa, ou até que o descolamento de retina tracional acometesse a mácula) reduzia a chance de se obter melhora da acuidade visual (acuidade visual melhor que 20/40), quando comparada à vitrectomia precoce (menos de 6 meses de história de hemorragia vítrea), sendo o  $p=0,01$  para essa comparação específica. Quando eram incluídos na análise apenas pacientes diabéticos do tipo 1, a diferença entre a conduta conservadora e a vitrectomia precoce era ainda mais significativa: 36% versus 12% após 2 anos de seguimento ( $p=0,001$ ). Em resumo, após 4 anos de estudo, o DRVS concluiu que a vitrectomia precoce está indicada para pacientes onde a retinopatia diabética proliferativa é mais grave, principalmente diabéticos do Tipo 1. (DRVS Research Group, 1990). Desde então, apesar de nenhum outro estudo multicêntrico para vitrectomia em pacientes diabéticos ter sido realizado, novas técnicas foram desenvolvidas, utilizando-se instrumentos mais delicados, que podem ser usados através da conjuntiva sem a necessidade de sutura da parede escleral,

contribuindo sobremaneira para uma cirurgia mais rápida (JORGE et al., 2007) e menos traumática para o paciente diabético (ECKARDT, 2003; FUJII et al., 2002).

#### **1.4.4.4 Agentes anti-VEGF**

O papel potencial do VEGF como mediador de neovascularização retiniana tem sido demonstrado em vários estudos. Níveis aumentados de VEGF foram encontrados na retina e vítreo de pacientes (ADAMIS et al., 1994; AIELLO et al., 1994) e animais laboratoriais (MILLER et al., 1994; PIERCE et al., 1995) com retinopatias isquêmicas, sugerindo que o VEGF exerça importante papel na neovascularização (NV) retiniana. Aiello et al. (1995) e Adamis et al. (1996) demonstraram que antagonistas de VEGF parcialmente inibiam a NV retiniana e de íris em modelos animais. O trabalho de Miller et al. (1994), o qual provocou oclusão venosa através da fotocoagulação a *LASER* em macacos *Cynomolgus*, demonstrou claramente a relação espacial e temporal entre o fator angiogênico secretado (VEGF) e o desenvolvimento de aumento da permeabilidade vascular e neovascularização ocular *in vivo*. No trabalho de Tolentino et al. (1996), injeções repetidas intravítreas de VEGF em primatas resultaram em neovascularização de íris e retiniana.

Com relação ao papel do VEGF na neovascularização, associada à retinopatia diabética proliferativa, as evidências *in vivo* são vastas. Níveis elevados de VEGF na retina e cavidade vítrea têm sido demonstrados em pacientes com retinopatia diabética, e em maior quantidade naqueles com retinopatia diabética proliferativa (ADAMIS et al., 1994; AIELLO et al., 1994; AMBATI et al., 1997; BOULTON et al., 1998; MALECAZE et al., 1994). Aiello et al. (1994) demonstraram níveis reduzidos de VEGF após

fotocoagulação, provavelmente por redução da produção desse fator após destruição da retina isquêmica, levando à regressão da doença. Amin et al. (1997) e Litty et al. (1996) verificaram imunopositividade do VEGF em retinas de pacientes diabéticos sem retinopatia proliferativa, sugerindo que a expressão do VEGF precede a neovascularização retiniana em indivíduos com diabetes (AMIN et al., 1997). Pe'er et al. (1995) demonstraram que a proliferação vascular na retinopatia diabética proliferativa, na oclusão de veia central da retina, descolamento de retina e tumores intra-oculares é acompanhada da indução da expressão do VEGF.

Além de seu importante papel na neovascularização intra-ocular, o VEGF também está associado à formação do edema macular diabético, tendo sido implicado tanto por achados clínicos quanto pré-clínicos na fisiopatologia dessa complicação do diabetes (STARITA et al., 2007). Os níveis de VEGF estão elevados em olhos de pacientes com edema macular diabético, e em modelos animais de diabetes essa elevação coincide com a quebra da barreira hemato-retiniana (STARITA et al., 2007). Funatsu et al. (2006) encontraram níveis mais elevados de VEGF no vítreo de pacientes com edema macular diabético do que em pacientes não diabéticos, ou diabéticos sem retinopatia, e, inversamente, verificaram níveis de PEDF menores no vítreo de pacientes com edema macular diabético do que em pacientes não diabéticos, ou diabéticos sem retinopatia, sugerindo que o VEGF e o PEDF têm efeitos antagônicos em relação à permeabilidade vascular no edema macular diabético.

Baseando-se nos efeitos do VEGF sobre a vasoproliferação e sobre o aumento da permeabilidade vascular acima mencionados, drogas para se bloquear esse fator têm sido empregadas para o tratamento da retinopatia diabética. A seguir serão

comentados os três agentes anti-VEGF mais utilizados para doenças coróide-retinianas, incluindo a retinopatia diabética.

#### **1.4.4.4.1 Pegaptanibe (Macugen®)**

O pegaptanibe sódico (Macugen, Eyetech Pharmaceuticals, Inc., New York, NY, and Pfizer Inc., New York, NY) é um aptâmero anti-VEGF que bloqueia especificamente a isoforma 165 deste fator. Essa droga foi inicialmente avaliada no tratamento da DMRI neovascular por meio de um estudo multicêntrico randomizado fase 3 (GRAGOUDAS et al., 2004). Frente aos resultados apresentados após 1 ano de seguimento, o pegaptanibe passou a ser a primeira medicação antiangiogênica para uso Intravítreo, destinada ao tratamento da DMRI, forma neovascular, aprovada pelo FDA norte-americano. No Brasil, a medicação já foi registrada na ANVISA e atualmente é comercializada pela empresa Pfizer.

Sabendo que o VEGF atua tanto no aumento da permeabilidade capilar (MURATA et al., 1995), como na angiogênese (FOLKMAN, 1971), o seu bloqueio pelo Macugen tem sido explorado em casos de edema macular diabético (CUNNINGHAM et al., 2005) e retinopatia diabética proliferativa (ADAMIS et al., 2006).

O *Macugen Diabetic Retinopathy Study Group* publicou de maneira pioneira o uso dessa droga anti-VEGF para o edema macular (CUNNINGHAM et al., 2005). Foram estudados prospectivamente 172 pacientes divididos em 4 grupos, incluindo um grupo controle, e outros três grupos que receberam doses diferentes de pegaptanibe: 0,3mg, 1mg e 3mg. A dose de 0,3mg foi a que melhor obteve resultados em termos de melhora da acuidade visual e redução da espessura da retina. Ao final de 36 semanas,



o grupo tratado com 0,3mg de pegaptanibe obteve melhora de 1 linha de visão contra nenhuma linha de visão ganha pelo grupo controle (placebo). A média de redução da espessura no grupo tratado com 0,3mg de pegaptanibe foi 68µm, contra ganho de 3,7 µm pelo grupo placebo. Durante esse estudo para edema macular, notou-se a regressão de neovasos de retina em alguns pacientes, o que motivou a avaliação retrospectiva de pacientes com retinopatia diabética proliferativa. Nessa análise retrospectiva, constatou-se que 62% dos pacientes tratados com pegaptanibe tiveram regressão de neovasos de retina após 36 semanas de tratamento com o antiangiogênico (ADAMIS et al., 2006).

Em resumo, o pegaptanibe foi o primeiro antiangiogênico prospectivamente testado para edema macular diabético e, como efeito secundário, contribuiu para a regressão de neovasos de retina.

#### **1.4.4.4.2 Ranibizumabe (Lucentis®)**

O ranibizumabe é o fragmento humanizado do sítio de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal contra o VEGF, desenvolvido pela empresa farmacêutica Genentech, e tem por principal finalidade se ligar e inibir a atividade do VEGF. Não obstante, diferentemente do pegaptanibe, o ranibizumabe inibe, em teoria, todas as isoformas do VEGF (incluindo a isoforma 165).

No começo de 2005, a Genentech anunciou os resultados do ensaio clínico randomizado fase III MARINA (*minimally classic CNV* ou *occult CNV lesions* em DMRI neovascular). Aproximadamente 95% dos pacientes tratados com ranibizumabe mantiveram ou melhoraram a visão após 1 ano de seguimento, sendo este resultado

mantido após 2 anos de seguimento (ROSENFELD et al., 2006a). Em novembro de 2005, a Genentech anunciou os resultados do ensaio clínico randomizado fase III ANCHOR (*lesões predominantemente clássicas* em DMRI neovascular). Após 1 ano de seguimento, aproximadamente 94% dos pacientes tratados com 0,3mg e 96% daqueles tratados com 0,5mg de ranibizumabe mantiveram ou apresentaram alguma melhora de acuidade visual (definido como perda de até 15 letras em acuidade visual), comparado com aproximadamente 64% daqueles submetidos à terapia fotodinâmica com verteporfina (Visudyne<sup>®</sup>) (BROWN et al., 2006). Após esses estudos clínicos pioneiros (MARINA e ANCHOR), outros estudos com injeções menos freqüentes de ranibizumabe estão em andamento (PIER, PrONTO e SAILOR) (ROSENFELD et al., 2006b), respaldando cada vez mais o uso desse agente antiangiogênico para casos de DMRI neovascular.

No tocante à retinopatia diabética, e de acordo com pesquisa no *PubMed*, não existe estudo publicado sobre o uso de ranibizumabe para a forma proliferativa dessa doença. Existem sim séries de casos onde o ranibizumabe foi utilizado para edema macular diabético. Em uma série de 10 casos de edema macular diabético, a administração mensal de 3 doses de ranibizumabe (5 pacientes tratados com 0,3mg e 5 pacientes tratados com 0,5mg) levou à redução da média da espessura macular de 45,3µm no grupo tratado com 0,3mg e de 197,8µm no grupo tratado com 0,5mg. No mês 3 (final do terceiro mês após a terceira injeção), 4 de 10 pacientes ganharam mais que 15 letras da tabela do ETDRS, cinco pacientes ganharam mais que 10 letras da mesma tabela e 8 ganharam mais que 1 letra em termos de acuidade visual (CHUN et al., 2006). Em outra série de 10 casos de pacientes diabéticos com edema macular

crônico, injeções repetidas de 0,5mg de ranibizumabe, administradas na consulta basal e 1, 2, 4 e 6 meses após a mesma, levaram à melhora da acuidade visual e redução da espessura macular no mês 7 do estudo (NGUYEN et al., 2006).

#### **1.4.4.4.3 Bevacizumabe (Avastin®)**

O bevacizumabe (Avastin®), diferentemente do pegaptanibe, é um anticorpo monoclonal humanizado, direcionado ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) circulante. Importante mencionar que o ranibizumabe (Lucentis®) foi desenvolvido pela Genentech a partir da fragmentação do bevacizumabe, uma vez que estudos experimentais teriam demonstrado que o bevacizumabe, quando injetado intravítreo, não penetraria a membrana limitante interna da retina neurosensorial (MORDENTI et al., 1999). Em outras palavras, pode-se dizer que o bevacizumabe é a molécula “mãe” do ranibizumabe.

Após os resultados de uma série de estudos clínicos fase II e III, o bevacizumabe foi aprovado em 26 de fevereiro de 2004, pelo FDA norte-americano, para o tratamento de primeira linha do câncer de cólon metastático, associado à quimioterapia baseada em 5-fluorouracil, passando a constituir a primeira droga anti-angiogênica aprovada para uso em humanos (KABBINAVAR et al., 2003; US Food and Drug Administration, 2004).

Cabe ao grupo liderado por Philip Rosenfeld o pioneirismo do uso sistêmico do Avastin para doenças oculares, mais especificamente: degeneração macular relacionada à idade. No primeiro estudo publicado pelo grupo, denominado SANA (*Systemic Avastin for Neovascular AMD*), os autores justificam a idéia do uso desse

agente anti-VEGF para pacientes com DMRI em 3 fatos: 1) resultados inicialmente promissores do uso de pegaptanibe para casos de DMRI; 2) bloqueio do VEGF foi capaz de inibir a neovascularização de coróide experimental (KRZYSTOLIK et al., 2002, SAISHIN et al., 2003); e 3) o bevacizumabe conjugado à fluoresceína vazava da neovascularização de coróide experimental em primatas (MICHELS et al., 2005).

Nas primeiras 12 semanas avaliou-se a segurança e efeitos na acuidade visual a curto prazo do uso sistêmico (endovenoso) de bevacizumabe em um pequeno número (n=9) de pacientes com DMRI neovascular. Todos os pacientes foram submetidos a uma infusão endovenosa de bevacizumabe (5mg/kg), seguida por mais 1 ou 2 infusões adicionais, em intervalos de 2 semanas, e seguidos até a semana 12. Ao término da pesquisa, aumentos significantes na AV foram evidentes na semana 1, após tratamento assim como na semana 12, com a mediana e média na pontuação de letras de AV aumentando em 8 letras e 12 letras, respectivamente. Em todos os olhos estudados a angiografia com fluoresceína demonstrou redução marcante ou ausência completa de vazamento de contraste da neovascularização de coróide.

Os primeiros relatos da utilização do bevacizumabe, por meio de injeção Intravítrea em oftalmologia, no tratamento de patologias coroidéias e retinianas, datam de agosto de 2005 (ROSENFELD et al., 2005a,b). Em um caso de NVC em atividade em paciente com degeneração macular, relacionada à idade, e em um caso de edema de mácula em paciente com oclusão da veia central da retina, observou-se melhora clinicamente significativa (>3 linhas ETDRS) na AV e completa restauração da arquitetura retiniana normal dentro do período de 4 semanas, após uma única injeção intravítreo de 1,0mg de bevacizumabe, em ambos os pacientes, sem constatação de

eventos adversos no período. Desde o pioneirismo desses primeiros casos, diversas doenças da retina já foram tratadas com Avastin intravítreo, incluindo casos de retinopatia diabética proliferativa e edema macular (AVERY et al., 2006b; COSTA et al., 2006; JORGE et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006; SILVA PAULA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006).

## 2 BEVACIZUMABE E RETINOPATIA DIABÉTICA PROLIFERATIVA

No Congresso da Sociedade Americana de Especialistas em Retina e Vítreo realizado em Montreal, Canadá, (2005), foi ministrada palestra pela doutora Christine Gonzales do grupo de pesquisa VISION (*VEGF inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group*), mostrando a regressão dos neovasos de retina em pacientes tratados com pegaptanibe para edema macular diabético. Na mesma época, o grupo liderado por Philip Rosenfeld publicou os primeiros relatos do uso intravítreo de bevacizumabe (ROSENFELD et al., 2005a,b). Desde então, sugeriu-se a idéia do uso intravítreo, como feito por Rosenfeld, do bevacizumabe, um agente antiangiogênico como o pegaptanibe, para pacientes diabéticos com neovascularização de retina persistente.

Os pacientes com neovasos de retina persistentes foram escolhidos para os estudos iniciais, pois já haviam sido submetidos a inúmeras sessões de fotocoagulação a LASER e sua neovascularização de retina não regredia (ETDRS Research Group, 1987). Pelo fato de apresentarem hemorragia vítrea de repetição e pelo risco de descolamento de retina tracional a longo prazo, restavam a esses pacientes, após ter se esgotado as inúmeras sessões de fotocoagulação a LASER, as seguintes opções: 1) tratamento conservador (deixar a hemorragia clarear e a longo prazo ter o risco de descolamento tracional de retina); ou 2) vitrectomia via *pars plana*, procedimento muito invasivo, com grandes chances de complicação. Como não agüentava mais sessões de LASER e como sabia que poderia realizar a vitrectomia, caso a injeção não resolvesse, a maioria dos pacientes com neovascularização de retina persistente, no final do ano de 2005, no ambulatório de Retina do HCFMRP-USP e no Hospital de

Olhos de Araraquara, optou pelo uso compassivo de bevacizumabe intravítreo.

Em março de 2006, foram publicados os primeiros relatos de tratamento de retinopatia diabética proliferativa com bevacizumabe, que comprovavam a teoria idealizadora do trabalho para casos de retinopatia diabética com neovascularização de retina persistente (JORGE et al., 2006). Avery relatou a regressão da neovascularização de retina e iriana em paciente com retinopatia diabética proliferativa, após a injeção intravítrea de 1,25mg de bevacizumabe (AVERY, 2006), o que também foi relatado por Davidorf et al. (2006), sendo que esses enfatizaram muito mais os achados no segmento anterior do globo ocular: íris e ângulo iridocorneano. Spaide e Fisher (2006) também estudaram pacientes com retinopatia diabética proliferativa e relataram a regressão da neovascularização de retina, acompanhada de melhora da hemorragia vítrea secundária e melhora da acuidade visual, 1 mês após a injeção intravítrea de 1,25 mg de bevacizumabe. Em outubro de 2006, Avery também publicou estudo de 45 olhos com seguimento médio de 5 semanas, mostrando regressão parcial ou total da neovascularização de retina e íris, após tratamento com dosagens variáveis (6,2 $\mu$ g - 1,25 $\mu$ g) de bevacizumabe intravítreo (AVERY et al., 2006a). Logo em seguida, em novembro de 2006, a primeira série prospectiva de 15 pacientes com neovascularização de retina persistente, durante os seus primeiros três meses de seguimento, foi publicada pelo grupo do Setor de Retina e Vítreo do HCFMRP-USP no periódico RETINA, como apresentado a seguir.

**2.1 INTRAVITREAL BEVACIZUMAB (AVASTIN) FOR  
PERSISTENT NEW VESSELS IN DIABETIC RETINOPATHY (IBEPE STUDY)**



# INTRAVITREAL BEVACIZUMAB (AVASTIN) FOR PERSISTENT NEW VESSELS IN DIABETIC RETINOPATHY (IBEPE STUDY)

RODRIGO JORGE, MD, PhD,\* ROGÉRIO A. COSTA, MD, PhD,\*†  
DANIELA CALUCCI, COMT,\*† LÉSSIA P. CINTRA, MD,\*  
INGRID U. SCOTT, MD, MPH‡

**Objective:** To evaluate the short-term fluorescein angiographic and visual acuity effects of a single intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for the management of persistent new vessels (NV) associated with diabetic retinopathy.

**Methods:** A prospective, nonrandomized open-label study of diabetic patients with actively leaking NV refractory to laser treatment and best-corrected Early Treatment Diabetic Retinopathy Study visual acuity (BCVA) worse than 20/40. Standardized ophthalmic evaluation was performed at baseline and at weeks 1, 6, and 12 ( $\pm 1$ ) following intravitreal injection of 1.5 mg of bevacizumab. Main outcome measures include changes in total area of fluorescein leakage from active NV and BCVA.

**Results:** Fifteen consecutive patients (men, 9 [60%]; women, 6 [40%]) were included and all completed the 12-week follow-up period of the study. The mean  $\pm$  SD age of participants was  $60.08 \pm 7.75$  years (median, 59.5; range, 49–73 years). At baseline, mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) NV leakage area was  $27.79 \pm 6.29$  mm<sup>2</sup>. The mean  $\pm$  SEM area of active leaking NV decreased significantly to  $5.43 \pm 2.18$  mm<sup>2</sup> and  $5.50 \pm 1.24$  mm<sup>2</sup> ( $P < 0.05$ , Tukey multiple comparisons post-test) at 1 and 12 weeks postinjection, respectively; at week 6 no leakage was observed. The mean  $\pm$  SEM logMAR (Snellen equivalent) BCVA improved significantly from  $0.90$  (20/160)  $\pm 0.11$  at baseline to  $0.76$  (20/125<sup>+2</sup>)  $\pm 0.12$ ,  $0.77$  (20/125<sup>+2</sup>)  $\pm 0.11$ , and  $0.77$  (20/125<sup>+2</sup>)  $\pm 0.12$  at weeks 1, 6, and 12, respectively ( $P < 0.05$ , Tukey multiple comparisons post-test). No major adverse events were observed.

**Conclusions:** Intravitreal injection of bevacizumab achieved short-term reduction of fluorescein leakage from persistent active NV without loss of vision in patients with diabetic retinopathy. Further studies to investigate the role of anti-VEGF therapy with bevacizumab for the management of diabetic retinopathy refractory to laser treatment are warranted.

RETINA 26:1006–1013, 2006

Retinal neovascularization represents an important risk factor for severe vision loss in patients with diabetes mellitus.<sup>1</sup> Approximately 60% of patients

with proliferative diabetic retinopathy respond to scatter laser treatment with regression of neovascularization within 3 months.<sup>2</sup> However, many patients require additional laser treatment and 4.5% require pars plana vitrectomy despite panretinal laser photocoagulation.<sup>3</sup> Although severe central vision loss due to proliferative diabetic retinopathy can be prevented by panretinal laser photocoagulation (PRP) in most cases, PRP is a destructive, expensive, and often painful procedure which is associated with such adverse effects as decreased peripheral vision, and proliferative diabetic retinopathy remains an important cause of visual impairment in patients with diabetes mellitus.

From the \*Retina and Vitreous Section, Department of Ophthalmology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo; †U.D.A.T.—Macular Imaging & Treatment Division, Hospital de Olhos de Araraquara, SP, Brazil; and ‡Departments of Ophthalmology and Health Evaluation Sciences, Penn State College of Medicine, Hershey, Pennsylvania.

This work was supported in part by Fundação de Apoio Ensino e Assistência, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

The authors report no conflicts of interest.

Reprint requests: Prof. Dr. Rodrigo Jorge, Departamento de Oftalmologia, FMRP/USP, Avenida Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto-SP 14049-900 Brazil; e-mail: rjorge@fmrp.usp.br

Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been implicated in human eye diseases characterized by neovascularization.<sup>4-7</sup> Intravitreal injection of VEGF into normal primate eyes induces the same pathologic processes seen in diabetic retinopathy, including microaneurysm formation and increased vascular permeability.<sup>8-10</sup> Levels of VEGF in the vitreous are highly correlated with growth of new vessels.<sup>5-7</sup> Blockage of VEGF has been associated with inhibition of iris neovascularization and suppression of retinal new vessel formation in primates.<sup>11,12</sup> Taken together, these findings provide the rationale for anti-VEGF therapy in retinal vascular diseases associated with new vessel formation, such as diabetic retinopathy.

Several clinical trials are currently evaluating the role of anti-VEGF agents for the treatment of ocular diseases associated with choroidal and/or retinal neovascularization and exudative processes. One of these agents, pegaptanib (Macugen; Eyetech Pharmaceuticals; New York, NY), is an anti-VEGF aptamer approved in December 2004 for intravitreal injection in the treatment of neovascular age-related macular degeneration (AMD),<sup>13</sup> and has demonstrated encouraging results for the treatment of macular edema and retinal neovascularization in diabetic patients.<sup>14,15</sup>

Bevacizumab (Avastin; Genentech, Inc.; South San Francisco, CA) is a full-length recombinant humanized monoclonal antibody directed against VEGF approved by the Food and Drug Administration for the treatment of metastatic colorectal cancer.<sup>16-20</sup> The antiangiogenic properties of bevacizumab, administered via intravenous infusion or intravitreal injection, have been studied in patients with choroidal neovascularization, macular edema, vitreous hemorrhage, and iris neovascularization.<sup>21-29</sup> Based on the promising results of anecdotal reports,<sup>22,25</sup> we have evaluated the effects of bevacizumab, used intravitreally as an off-label indication, in diabetic patients with persistent new vessels (NV) refractory to laser treatment. This article reports the first 15 patients treated with intravitreal bevacizumab through 12 weeks of follow-up.

### Methods

The study protocol adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the local Institutional Review Board, and all participants gave written informed consent before entering in the study. All diabetic patients evaluated at the Retina and Vitreous Section of the Department of Ophthalmology, School of Medicine of Ribeirão Preto, and at U.D.A.T.-Hospital de Olhos de Araraquara, with a diagnosis of persistent NV between September and November 2005 were invited to participate in the study. Through-

out the study, measurement of the best-corrected visual acuity (BCVA) was performed by a single certified examiner before any other study procedure. Ophthalmic evaluation was performed by a single retinal specialist (R.J.) and stereoscopic fundus photography and fluorescein angiography were performed by a single certified ophthalmic technician (D.C.). Study data were interpreted and analyzed by R.A.C. and I.U.S.

### Patient Eligibility and Baseline Evaluation

Patients were included if they had 1) persistent NV, defined as active NV (fine retinal vessels with dilated buds or tips covered with hemorrhage or associated with recurrent vitreous hemorrhage or paucity of accompanying fibrous tissue and/or increased in extent compared to previous visit),<sup>30</sup> unresponsive to complete panretinal laser photocoagulation performed at least 4 months prior; and 2) logarithm of minimum angle of resolution (logMAR) BCVA of 0.3 (Snellen equivalent, 20/40) or worse. Exclusion criteria included 1) history of vitrectomy in the study eye; 2) history of thromboembolic event (including myocardial infarction or cerebral vascular accident); 3) major surgery within the prior 6 months or planned within the next 28 days; 4) uncontrolled hypertension (according to guidelines of the seventh report of the joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure [JNC-7])<sup>31</sup>; or 5) known coagulation abnormalities or current use of anticoagulative medication other than aspirin.

During the study enrollment period, persistent NV was identified in one eye of 3 patients and in both eyes of 13 patients based on clinical examination and confirmed by fluorescein angiography evaluation. If both eyes were eligible for treatment, the eye with worse visual acuity was included in the study. Fifteen eyes of 15 patients were included in the study (one patient declined study participation due to fear of the intravitreal injection procedure).

At baseline, each patient received a detailed ophthalmologic examination including measurement of BCVA according to a standardized refraction protocol using a retroilluminated Lighthouse for the Blind distance visual acuity test chart (using modified ETDRS charts 1, 2, and R), as well as applanation tonometry, undilated and dilated slit lamp biomicroscopic examinations (including lenticular status using the Lens Opacities Classification System III),<sup>32</sup> and indirect funduscopic examination. Stereoscopic digital color fundus photography and fluorescein angiography were performed using two certified fundus camera systems

Table 1. Clinical Characteristics, Total Area of Active New Vessels (Measured in mm<sup>2</sup>) By Fluorescein Angiography, and Best-Corrected ETDRS Visual Acuity (Logarithm of the Minimum Angle of Resolution Values) Noted at Baseline and During the 12-Week Study Period of Diabetic Patients With Persistent New Vessels Treated With One Single Intravitreal Injection of 1.5 mg Bevacizumab

Case	Sex	Age, yr	DM Type, yr	DM Duration, yr	HbA1C (%)	Baseline		Week 1		Week 6		Week 12	
						NV Area	BCVA	NV Area	BCVA	NV Area	BCVA	NV Area	BCVA
1	M	52	II	12	9.6	24.16	0.52	3.30	0.52	0	0.40	4.55	0.30
2	M	60	II	16	11.0	14.15	0.30	0	0.24	0	0.30	8.55	0.24
3	M	39	II	6	9.1	1.07	0.80	0	0.64	0	0.46	0.50	0.56
4	M	58	II	14	9.4	10.38	1.14	0	1.10	0	1.10	1.80	1.10
5	M	50	II	5	11.0	74.20	0.30	8.85	0.00	0	0.00	15.54	0.00
6	F	67	II	14	9.3	38.53	0.96	2.97	0.86	0	0.84	7.45	0.94
7	F	73	II	10	7.1	10.91	1.6	1.89	1.64	0	1.60	1.63	1.60
8	F	34	I	15	6.5	89.16	0.42	33.43	0.12	0	0.40	15.60	0.42
9	F	65	II	12	6.7	17.38	1.24	1.07	1.10	0	1.30	3.48	1.30
10	F	65	II	18	7.8	25.07	0.96	3.99	0.70	0	0.60	5.30	0.64
11	F	35	I	16	6.3	34.75	0.30	9.59	0.30	0	0.34	6.55	0.32
12	M	56	II	15	8.1	6.47	1.06	0	1.10	0	0.96	0	0.98
13	M	53	II	10	10.1	31.59	1.1	2.61	0.84	0	0.80	1.56	0.84
14	M	62	II	10	8.9	20.15	1.6	4.25	1.30	0	1.32	5.40	1.34
15	F	68	II	3	9.9	18.91	1.22	9.59	1.06	0	1.12	4.70	1.10

ETDRS = Early Treatment Diabetic Retinopathy Study; DM = diabetes mellitus; HbA1C = glycosylated hemoglobin A1C; NV = new vessel; BCVA = best-corrected visual acuity; logMAR = logarithm of minimum angle of resolution.

(UVi-60/EyeQ Pro; Canon, Tokyo, Japan, and TRC-501A/IMAGEnet; Topcon, Tokyo, Japan).

#### Treatment Assignment

All patients received one intravitreal injection of 1.5 mg (0.06 mL) of bevacizumab. All treatments were performed by a single retinal specialist (R.J.) using topical proparacaine drops under sterile condi-

tions (eyelid speculum and povidone-iodine). Bevacizumab was injected into the vitreous cavity using a 29½ gauge needle inserted through the inferotemporal pars plana 3.0 to 3.5 mm posterior to the limbus. After the injection, central retinal artery perfusion was confirmed with indirect ophthalmoscopy. Patients were instructed to instill one drop of 0.3% ciprofloxacin

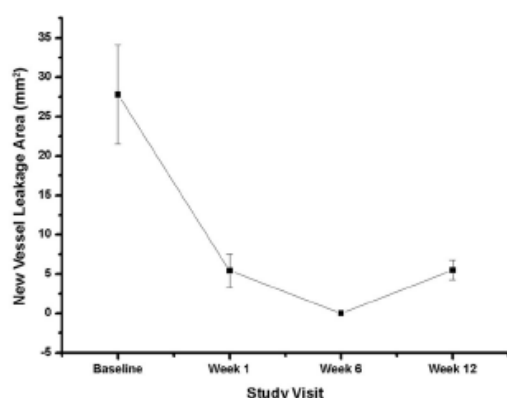


Fig. 1. Total area (measured in mm<sup>2</sup>) of fluorescein leakage from active new vessels after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment by visit in diabetic patients with persistent actively leaking new vessels (asterisks indicate significant changes from baseline values [ $*P < 0.05$ ; Tukey HSD multiple comparisons test]).

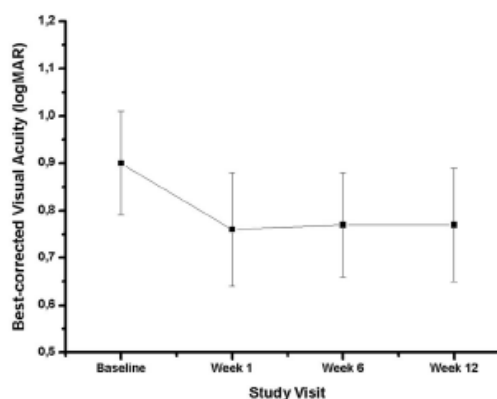


Fig. 2. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) best-corrected visual acuity (in logarithm of the minimum angle of resolution values) after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment by visit in diabetic patients with persistent actively leaking new vessels (asterisks indicate significant changes from baseline values [ $*P < 0.05$ ; Tukey HSD multiple comparisons test]).



into the injected eye four times daily for 1 week after the procedure.

#### Follow-Up Examinations and Outcome Measures

Patients were scheduled for follow-up examinations at weeks 1, 6, and 12 ( $\pm 1$ ) after treatment. The same procedures performed at baseline were performed at each study visit (e.g., BCVA, complete ophthalmic examination, photography, and FA). Systemic and local adverse events were monitored throughout the study, including changes in intraocular pressure and lens status.

Two measures were used to evaluate the short-term effects of bevacizumab: 1) the total area (measured in  $\text{mm}^2$ ) of fluorescein leakage from active NV (NVD and/or NVE) and 2) changes in logMAR BCVA. When there was more than one site of active NV, all sites were considered for analysis.

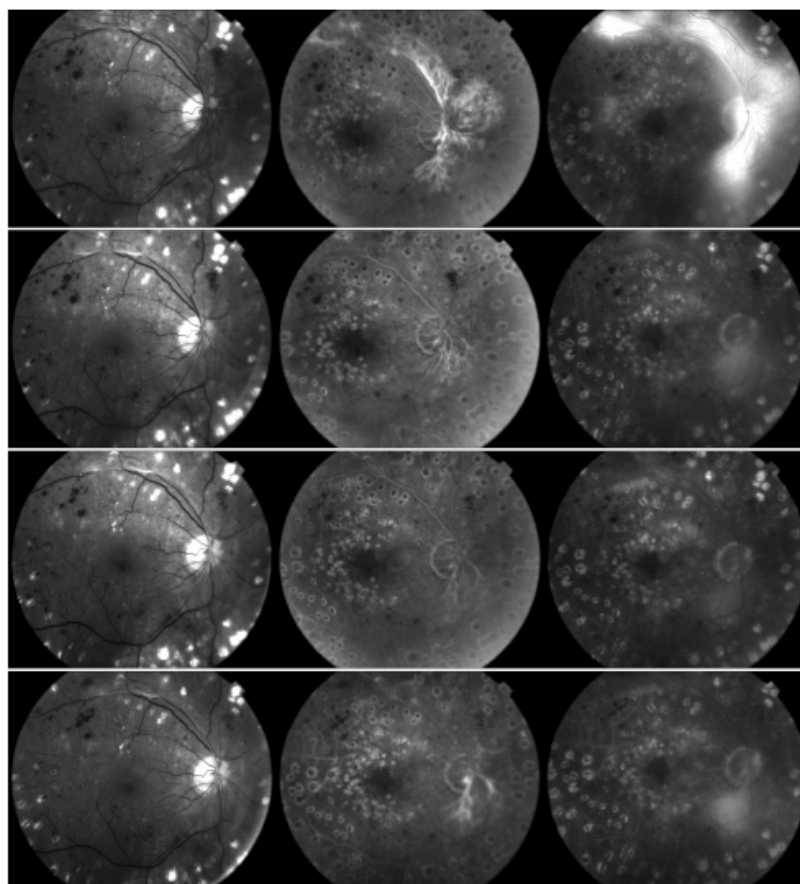
#### Statistical Analysis

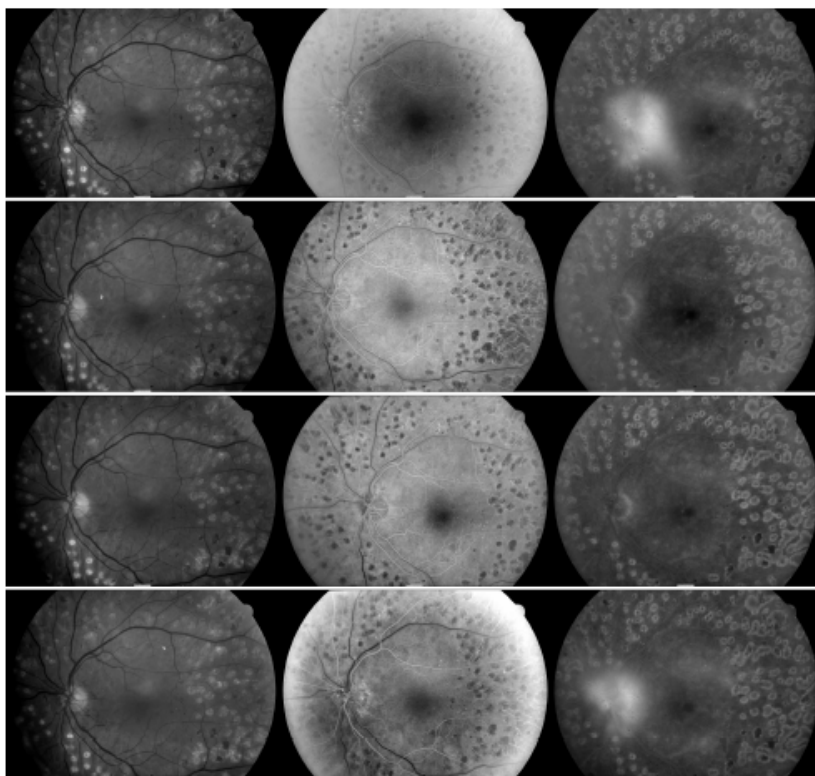
One-way analysis of variance for repeated measures (ANOVA) with Tukey multiple comparisons post-test was used to evaluate differences in NV area, logMAR BCVA, and intraocular pressure between each visit. The significance level adopted was 0.05.

#### Results

All 15 patients completed the 12-week follow-up evaluation. Of the 15 participants, 9 (60%) were men and 6 (40%) were women. The mean  $\pm$  SD age was  $60.08 \pm 7.75$  years (median, 59.5; range, 49–73 years). The mean  $\pm$  SD duration of diabetes was  $11.73 \pm 4.39$  years (median, 12; range: 3–18 years). Twelve of the 15 patients (80%) had a glycosylated hemoglobin level above 7%. Baseline characteristics are summarized in Table 1. No serious drug-related

**Fig. 3.** Red free, early- and late-phase fluorescein angiography from a diabetic patient with persistent active new vessels 5½ months after pan-retinal laser photocoagulation (Case 1). **(Top)** Actively leaking new vessels at baseline; some fluorescein leakage also within the macula. **(Top center)** Marked decreased in fluorescein leakage from new vessels noted at baseline could be seen as early as 1 week after an intravitreal injection of 1.5 mg of bevacizumab. **(Bottom center)** At 6 weeks, some staining but no fluorescein leakage from new vessels and within the macula. **(Bottom)** Twelve weeks after injection minimal fluorescein leakage is observed from new vessels noted at baseline.





**Fig. 4.** Red free, early- and late-phase fluorescein angiography from a diabetic patient with persistent active new vessels 7 months after pan-retinal laser photocoagulation (Case 2). (**Top**) Actively leaking new vessels at baseline. (**Top and bottom center**) At weeks 1 and 6, no fluorescein leakage is present from new vessels noted at baseline after an intravitreal injection of 1.5 mg of bevacizumab. (**Bottom**) Twelve weeks after injection fluorescein leakage recurred from new vessels noted at baseline; however, area of leakage corresponds to 60% of that noted at baseline.

adverse events were observed for the 15 patients treated in this study. Overall, the treatment procedure was well tolerated, and no clinical evidence of uveitis, endophthalmitis, or ocular toxicity was observed. The mean ( $\pm$  SEM) intraocular pressure at baseline was  $14.93 \pm 0.77$ , and did not vary significantly at 1 week ( $15.33 \pm 0.84$ ), 6 weeks ( $15.20 \pm 0.78$ ), and 12 weeks after injection ( $15.26 \pm 0.81$ ) ( $P = 0.75$ ; one-way analysis of variance for repeated measures). Further, no changes in lens status were observed in any of the 15 eyes during the 12-week follow-up period. Minor local adverse events related to the treatment procedure, such as subconjunctival hemorrhage and foreign body sensation, were reported in 26.6% (4/15) and 6.6% (1/15) of patients, respectively. These events were transient and resolved in all five patients by 1 week after injection.

#### Outcome Measures

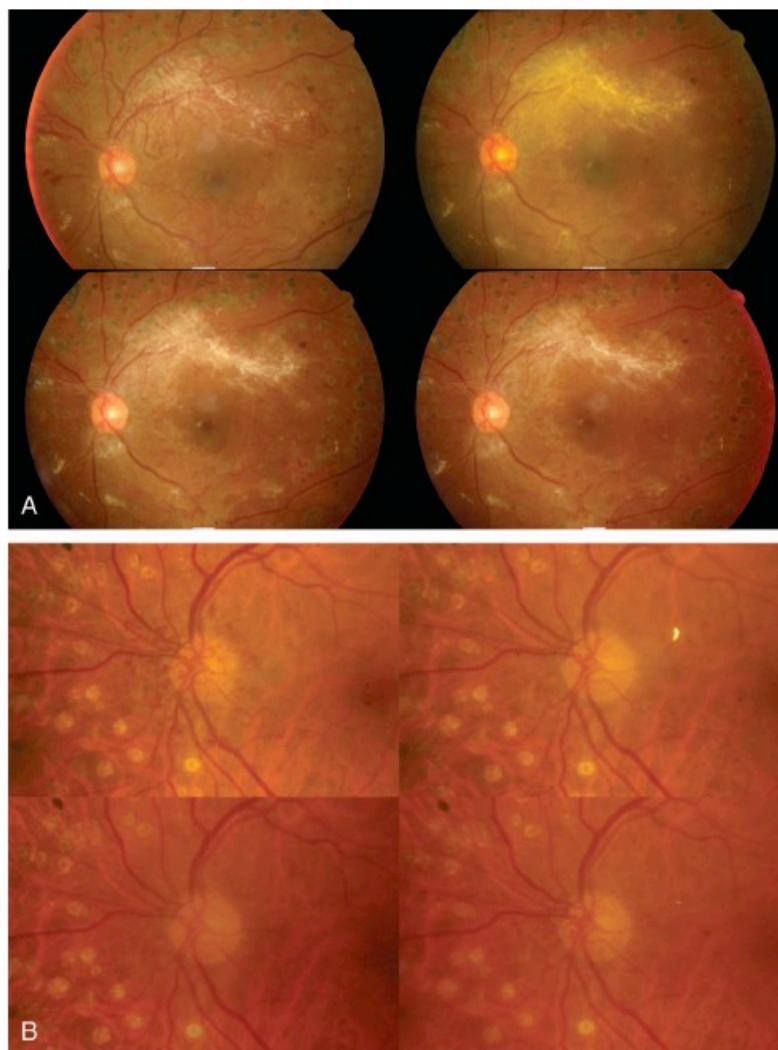
The mean ( $\pm$  SEM) area of active NV noted at baseline ( $27.79 [\pm 6.29] \text{ mm}^2$ ) decreased significantly to  $5.43 \pm 2.18 \text{ mm}^2$  ( $P < 0.05$ ) 1 week after treat-

ment. At week 6, absence of fluorescein leakage from active NV was documented in all 15 eyes. Twelve weeks after injection, some fluorescein leakage from areas of active NV noted at baseline was observed in 14/15 (93%) eyes; however, the mean  $\pm$  SEM active NV area of  $5.50 \text{ mm}^2 \pm 1.24$  was significantly smaller than at baseline ( $P < 0.05$ ) (Table 1; Figure 1).

The mean  $\pm$  SEM logMAR (Snellen equivalent) BCVA at baseline was  $0.90$  (20/160)  $\pm 0.11$ . The mean  $\pm$  SEM logMAR (Snellen equivalent) BCVA improved significantly to  $0.76$  (20/125<sup>+</sup>)  $\pm 0.12$ ,  $0.77$  (20/125<sup>+</sup>)  $\pm 0.11$ , and  $0.77$  (20/125<sup>+</sup>)  $\pm 0.12$  at weeks 1, 6, and 12, respectively ( $P < 0.05$ , Tukey multiple comparisons post-test) (Table 1; Figure 2).

#### Discussion

During the past several years, anti-VEGF therapy has been investigated as a treatment option for ocular neovascularization and exudative processes in humans. Intravitreal injection of the anti-VEGF aptamer, pegaptanib, has recently demonstrated promising results for the treatment of diabetic macular edema in a



**Fig. 5.** Color fundus photography from two diabetic patients (superior [A] and inferior [B] photomontages) with persistent active new vessels after panretinal laser photocoagulation taken at baseline (top left) and at 1 week (top right), 6 weeks (bottom left), and 12 weeks (bottom right) after bevacizumab treatment. Remarkable regression of new vessels channels observed at baseline is seen in both cases at weeks 1 and 6 after one single intravitreal injection of 1.5 mg of bevacizumab. Twelve weeks after injection partial recurrence is seen in both cases; however, density of new vessels channels is clearly diminished by comparison with baseline.

phase II study.<sup>14</sup> In the latter study, patients assigned to intravitreal injections of pegaptanib had better visual acuity outcomes, were more likely to show reduction in central retinal thickness, and were deemed less likely to need additional therapy with laser photocoagulation at follow-up compared to patients assigned to sham injections.<sup>14</sup> Additionally, upon retrospective review of photographs taken as part of the study protocol, it was demonstrated that regression of associated retinal neovascularization was observed in 8/13 (62%) treated eyes.<sup>15</sup>

In the current report we have prospectively evaluated the effects of a single intravitreal injection of the anti-VEGF antibody, bevacizumab, in patients with diabetic retinopathy and actively leaking NV refractory to panretinal laser photocoagulation. No major adverse event associated with the treatment was observed during the 12-week follow-up period of this study.

One week after treatment, leakage from active NV as evidenced by fluorescein angiography was diminished in 11/15 (74%) and absent in the remaining 4



(26%) patients. Complete absence of leakage was demonstrated in all 15 treated patients at week 6 (Figure 3). At postinjection week 12, some fluorescein leakage was seen within the area of active NV identified at baseline in 14/15 (93%) eyes. However, the mean area of active leaking NV noted at week 12 was significantly decreased when compared to the baseline area of leakage. In these 14 patients, active NV area noted at the week 12 evaluation measured less than 25% of the area noted at baseline in 11 (78.6%) patients (Table 1). In the remaining three eyes, the area of fluorescein leakage corresponded to 26.8%, 46.7%, and 60% (Figure 4) of the area of leakage noted at baseline. New or enlarged areas of active NV were not observed in any patient.

The results of the current study demonstrate a temporal correlation between drug injection and decrease in active leaking NV area, thus suggesting a cause-and-effect relationship, which is consistent with previous reports of retinal neovascularization regression after anti-VEGF therapy in experimental and human studies.<sup>8–10,15</sup> Of the scheduled follow-up intervals in this study, the maximum drug-related effects on persistent NV were evident at week 6, when complete absence of leakage from the NV noted at baseline was demonstrated in all patients. The recurrence of NV leakage observed in 14/15 (93%) eyes at week 12 is not surprising. Mordenti et al demonstrated that a full-length human monoclonal antibody has a terminal half-life of 5.6 days in the rabbit vitreous cavity after a 25  $\mu\text{g}$  injection.<sup>33</sup> Considering that the human vitreous cavity volume is 3.0 times greater than the vitreous cavity of a rabbit and the use of a 60-fold higher dosage of bevacizumab (1,500  $\mu\text{g}$ ), the intravitreal bevacizumab dose used in the current study is comparable to a 500  $\mu\text{g}$  dose in rabbit eyes, which may explain the drug effect duration with regards to NV regression in the current study (Figure 5).

The mean BCVA was improved significantly compared to baseline at all study follow-up visits. A small visual acuity decrease was measured at the last follow-up visit in two patients (–0.6 ETDRS lines [Patient 9] and –0.2 ETDRS lines [Patient 11]). Diffuse and/or focal fluorescein leakage noted at baseline within the macular area was decreased to some extent at all study follow-up visits and, in one patient, clearance of vitreous hemorrhage may also have been associated with some visual acuity improvement.

In conclusion, a single intravitreal injection of 1.5 mg bevacizumab was associated with rapid regression of persistent NV associated with diabetic retinopathy (refractory to panretinal laser photocoagulation) as well as improvement in visual acuity for at least 12 weeks. While fluorescein angiographic evaluation

suggests that the drug-induced effects on NV are transient, anti-VEGF therapy using intravitreal bevacizumab may control this vision-threatening condition at least temporarily and, consequently, delay or prevent its main complications (vitreous hemorrhage and tractional retinal detachment). Whether the observed short-term effects may be sustained with additional injections remains to be determined.

Anecdotal reports have launched the era of angiogenic pharmacomodulation with intravitreal bevacizumab for chorioretinal diseases.<sup>22,25</sup> Positive results from preliminary safety studies in rabbits<sup>34,35</sup> and humans,<sup>36</sup> as well as additional reports about the clinical use of intravitreal bevacizumab, have become available.<sup>24,26–29</sup> Further studies are necessary to determine the safety and efficacy of intravitreal bevacizumab, the potential value of repeated injections, and the optimal reinjection frequency, and to compare the results of intravitreal bevacizumab with other treatment modalities for various disease entities.

**Key words:** angiogenesis, diabetes, pegaptanib, photocoagulation, ranibizumab, retinopathy, VEGF.

#### References

1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. *Ophthalmology* 1991;98:823–833.
2. Vander JF, Duker JS, Benson WE, et al. Long-term stability and visual outcome after favorable initial response of proliferative diabetic retinopathy to panretinal photocoagulation. *Ophthalmology* 1991;98:1575–1579.
3. Flynn HW Jr, Chew EY, Simons BD, et al. Pars plana vitrectomy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study. ETDRS report number 17. *Ophthalmology* 1992;99:1351–1357.
4. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182–1186.
5. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445–450.
6. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994;331:1480–1487.
7. Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, et al. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994;112:1476–1482.
8. Tolentino MJ, McLeod DS, Taomoto M, et al. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am J Ophthalmol* 2002;133:373–385.
9. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, et al. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996;114:964–970.

10. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, et al. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 1996;103:1820-1828.
11. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996;114:66-71.
12. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, et al. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10457-10461.
13. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, et al. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004;351:2805-2816.
14. Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M, et al. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2005;112:1747-1757.
15. Adamis AP, Altaweel M, Bressler NM, et al. Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. *Ophthalmology* 2006;113:23-28.
16. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:427-434.
17. Adding a humanized antibody to vascular endothelial growth factor (bevacizumab, Avastin) to chemotherapy improves survival in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2003;8:85-88.
18. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:60-65.
19. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-2342.
20. Yang JC. Bevacizumab for patients with metastatic renal cancer: an update. *Clin Cancer Res* 2004;10:S6367-S6370.
21. Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2005;112:1035-1047.
22. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005;36:33133-33135.
23. Nguyen QD, Shah S, Tatlipinar S, et al. Bevacizumab suppresses choroidal neovascularisation caused by pathological myopia. *Br J Ophthalmol* 2005;89:1368-1370.
24. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;113:363-372.
25. Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005;36:336-339.
26. Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: A short-term study. *Retina* 2006;26:279-284.
27. Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 2006;26:275-278.
28. Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;113:363-372.e5. Epub 2006 Feb 3.
29. Avery RL. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006;26:352-354.
30. The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group. Early vitrectomy for severe proliferative diabetic retinopathy in eyes with useful vision. Results of a randomized trial—Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Report 3. *Ophthalmology* 1988;95:1307-1320.
31. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003;289:2560-2572. Erratum in: *JAMA* 2003;290:197.
32. Chylack LT, Wolfe JK, Singer DM, et al. The lens opacities classification system III. *Arch Ophthalmol* 1993;111:831-836.
33. Mordenti J, Thomsen K, Licko V, et al. Intraocular pharmacokinetics and safety of a humanized monoclonal antibody in rabbits after intravitreal administration of a solution or a PLGA microsphere formulation. *Toxicol Sci* 1999;52:101-106.
34. Shahar J, Avery RL, Heilweil G, et al. Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin). *Retina* 2006;26:262-269.
35. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M. Testing intravitreal toxicity of bevacizumab (Avastin). *Retina* 2006;26:257-261.
36. Maturi RK, Bleau LA, Wilson DL. Electrophysiologic findings after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006;26:270-274.



Este primeiro estudo serviu como base para se mostrar a boa resposta da regressão do neovaso de retina, após o bloqueio do VEGF pelo anticorpo bevacizumabe na cavidade vítrea, em pacientes diabéticos com neovascularização de retina persistente. Diferentemente dos trabalhos publicados até então, a dose utilizada foi padronizada, assim como a forma de se medir a área de vazamento de fluoresceína de neovasos ativos. Nenhum estudo até então havia transformado em números os achados angiofluoresceinográficos. Pôde-se verificar o ciclo da resposta da neovascularização de retina ao tratamento com bevacizumabe: redução de 80% da área após 1 semana da injeção, completa regressão após 6 semanas e recorrência com 12 semanas, em tamanho menor. Também vale apontar que não houve aumento da ocorrência ou progressão de catarata, como também não houve alterações significativas da pressão intra-ocular nos pacientes do estudo IBEPE, comprovando achados de estudos anteriores (AVERY; 2006; AVERY et al., 2006a; SPAIDE & FISHER, 2006). Após esse estudo e até maio de 2007, não foram publicados novos trabalhos envolvendo retinopatia diabética proliferativa e bevacizumabe intravítreo, de acordo com arquivo digital gratuito de literatura biomédica, desenvolvido pela Livraria Nacional de Medicina, *PubMed*.

Tendo feito o primeiro estudo testando-se o bevacizumabe em pacientes que praticamente não tinham outra opção se não a vitrectomia via *pars plana* e tendo notado o efeito transitório do bevacizumabe sobre a neovascularização de retina, o próximo passo seria associar o novo tratamento (anti-angiogênico intravítreo) ao tradicional (panfotocoagulação a LASER). Deste modo ter-se-ia a associação do efeito transitório, porém altamente eficaz do bevacizumabe (adjuvante) em induzir a

regressão nos neovasos de retina com o efeito lento, porém definitivo e duradouro da fotocoagulação a *LASER*, também sobre a neovascularização de retina. Para estudar-se o efeito dessa associação, optou-se por tratar pacientes com retinopatia diabética proliferativa de alto risco. Isso porque esses pacientes tinham *chance* de 26% de perda visual grave ( $AV < 5/200$ ) em 2 anos, caso não recebessem tratamento com panfotocoagulação a *LASER* (DRS *Research Group*, 1979). Estudou-se, portanto, pacientes que indiscutivelmente necessitavam com urgência de tratamento a *LASER*. O estudo incluiu 2 grupos: o primeiro grupo de pacientes recebeu apenas o tratamento tradicional (panfotocoagulação de retina a *LASER*; grupo *PRP*) e o segundo grupo de pacientes recebeu, além da panfotocoagulação de retina, uma injeção intravítrea de 1,5 mg de bevacizumabe (grupo *PRP plus*). Dessa forma, poder-se-ia verificar o efeito da associação do *LASER* ao antiangiogênico e comparar os resultados da associação com o tratamento tradicional. Os resultados das primeiras 16 semanas desse estudo foram enviados para publicação no periódico *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, como apresentado a seguir.

**2.2 PAN-RETINAL PHOTOCOAGULATION (PRP) VERSUS  
PRP PLUS INTRAVITREAL BEVACIZUMAB (AVASTIN) FOR HIGH-RISK  
PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY (IBEHI STUDY)**

# Acta Ophthalmologica Scandinavica

## Pan-Retinal Photocoagulation (PRP) Versus PRP Plus Intravitreal Bevacizumab (Avastin®) for High-Risk Proliferative Diabetic Retinopathy (IBeHi Study)

Journal:	<i>Acta Ophthalmologica Scandinavica</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Tonello, Matheus; School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ophthalmology Costa, Rogerio; U.D.A.T. - Hospital de Olhos de Araraquara, Retinal Diagnosis and Treatment Division Almeida, Felipe; School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ophthalmology Barbosa, José; Universidade Estadual Paulista, Exact Sciences Scott, Ingrid; Penn State College of Medicine, Ophthalmology and Health Evaluation Sciences Jorge, Rodrigo; School of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ophthalmology
Keywords:	Angiogenesis, Diabetes, Laser, Treatment, Vascular endothelial growth factor (VEGF)

1  
2  
3  
4 **Pan-Retinal Photocoagulation (PRP) Versus PRP Plus Intravitreal Bevacizumab**  
5  
6 **(Avastin<sup>®</sup>) for High-Risk Proliferative Diabetic Retinopathy (IBeHi Study)**  
7  
8

9  
10  
11 Matheus Tonello, MD,<sup>1</sup> Rogério A. Costa MD, PhD,<sup>1,2</sup> Felipe P. P. Almeida MD,<sup>1</sup>

12 José C. Barbosa, PhD,<sup>3</sup> Ingrid U. Scott, MD, MPH,<sup>4</sup> Rodrigo Jorge, MD, PhD<sup>1</sup>  
13  
14  
15

16  
17 From the <sup>1</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto,  
18 SP, Brazil; <sup>2</sup>U.D.A.T. – Macular Imaging and Treatment Division, Hospital de Olhos de  
19 Araraquara, Araraquara, SP, Brazil; <sup>3</sup>Exact Sciences Department, Universidade Estadual  
20 Paulista, Jaboticabal, SP, Brazil; and <sup>4</sup>Departments of Ophthalmology and Health Evaluation  
21 Sciences, Penn State College of Medicine, Hershey, PA, USA  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 Correspondence to:

31 Rodrigo Jorge, MD, PhD

32 Departamento de Oftalmologia, FMRP / USP

33 Avenida Bandeirantes 3900. Ribeirão Preto-SP 14049-900 BRAZIL

34  
35 Phone/fax: 55 (16) 3602-2523/3602-2860 E-mail: [rjorge@fmrp.usp.br](mailto:rjorge@fmrp.usp.br)  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43 This work was supported in part by Fundação de Apoio Ensino e Assistência, Hospital das  
44 Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.  
45  
46  
47  
48

49 Disclosure: M. Tonello, None; R. Costa, None; F. Almeida, None; J. Barbosa, None;

50 I. Scott, None; R. Jorge, None.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**KEY WORDS**

Angiogenesis; Diabetes; Laser; Treatment; Vascular endothelial growth factor (VEGF).

For Peer Review

**ABSTRACT**

**Objective:** To evaluate the effects of pan-retinal photocoagulation (PRP) compared with PRP plus intravitreal bevacizumab for the treatment of patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy (PDR).

**Methods:** Prospective study including patients with high-risk PDR and no prior laser treatment who were randomly assigned to receive PRP ("PRP" group) or PRP plus intravitreal injection of 1.5mg of bevacizumab ("PRP plus" group). In all patients, the PRP session was administered in two episodes (week 1 and 3), with the intravitreal bevacizumab performed at the end of the second laser episode in the PRP plus group. Standardized ophthalmic evaluation including Early Treatment Diabetic Retinopathy Study best-corrected visual acuity (BCVA) as well as stereoscopic fundus photography and fluorescein angiography were performed at baseline and at weeks 4, 9 ( $\pm 1$ ), and 16 ( $\pm 2$ ). Main outcomes measures included changes in BCVA and in total area of fluorescein leakage from active new vessel (NV).

**Results:** Twenty-two (n = 30 eyes) consecutive patients completed the 16-week follow-up period of the study. There was no significant difference between the PRP and PRP plus groups in respect to age, gender, type or duration of diabetes, area of fluorescein leakage from active NV, and BCVA. No significant difference in BCVA was observed between both groups throughout the study period. However, the total area of actively leaking NVs was significantly reduced in the PRP plus group when compared with the PRP group at weeks 4, 9 and 16 ( $P < 0.001$ ). No major adverse events were identified.

**Conclusions:** In the short term, the adjunctive use of intravitreal bevacizumab with PRP was associated with a greater reduction in the area of active leaking NVs than PRP alone in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Diabetic retinopathy is the most common cause of vision loss in working-aged individuals in developed nations (Klein 1992). Retinal new vessels (NV) represents an important risk factor for severe vision loss in patients with diabetes mellitus.(ETDRS Research Group. 1991b) About 60% of patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) respond to pan-retinal photocoagulation (PRP) with regression of neovascularization within 3 months (Vander et al. 1991). However, many patients require additional laser treatment, and 4.5% ultimately require *pars plana* vitrectomy despite PRP (Flynn et al. 1992). Although severe central vision loss due to PDR can be prevented with PRP in most cases, this destructive, often painful, laser procedure may be associated with decreased peripheral vision and increased risk of macular edema (ETDRS Research Group, 1991a).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been implicated in the pathogenesis of human eye diseases characterized by neovascularization (Adamis et al. 1994; Aiello et al. 1994; Folkman 1971; Malecaze et al. 1994) and blockage of VEGF has been associated with inhibition of iris neovascularization and suppression of retinal NV formation in primates (Adamis et al. 1996; Aiello et al. 1995) and in humans. Several clinical trials are currently evaluating the role of anti-VEGF agents, such as pegaptanib and ranibizumab (Adamis et al. 2006; Chun et al. 2006; Cunningham et al. 2005) for the treatment of macular edema and retinal NVs in diabetic patients with encouraging preliminary results. More recently, regression of disc NVs was demonstrated after intravitreal injection of the antiangiogenic agent bevacizumab (Avastin®; Genentech, Inc.; South San Francisco, CA) in the setting of diabetic retinopathy (Avery 2006a; Spaide & Fisher, 2006). Nevertheless, this effect seems to be transient as retinal NVs tended to recur by 12 weeks after a single intravitreal injection of bevacizumab (Jorge et al. 2006). Therefore, in the present study, we aimed to investigate the possible synergistic effects of intravitreal bevacizumab when used in combination with PRP for the treatment of patients with high-risk PDR.



## METHODS

The study protocol adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the local Institutional Review Board, and all participants gave written informed consent before entering in the study. Between March 2006 and October 2006, all patients evaluated at the Retina and Vitreous Section of the Department of Ophthalmology, School of Medicine of Ribeirão Preto, and at U.D.A.T. – Hospital de Olhos de Araraquara, who presented with high-risk PDR and had not received any prior retinal laser treatment were invited to participate in the study. Throughout the study, measurement of the best-corrected visual acuity (BCVA) was performed by a single masked certified examiner prior to any other study procedure. Ophthalmic evaluation was performed by a single retinal specialist (FPPA) and stereoscopic fundus photography and fluorescein angiography were performed by a single examiner (MT). Study data were interpreted and analyzed by RAC.

### Patient Eligibility and Baseline Evaluation

Patients were included if they had high-risk PDR, which was defined according to the guidelines set forth by the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), as follows (The diabetic retinopathy study Research Group, 1979; ETDRS Research Group, 1991b): 1) presence of NVs at the disc (NVD) greater than ETDRS standard photograph 10A, or; 2) presence of NVD associated with vitreous or pre-retinal hemorrhage, or; 3) NVs elsewhere (NVE) with more than a half disk area associated with vitreous or pre-retinal hemorrhage. Exclusion criteria included: 1) history of prior laser treatment or vitrectomy in the study eye; 2) history of thromboembolic event (including myocardial infarction or cerebral vascular accident); 3) major surgery within the prior 6 months or planned within the next 28 days; 4) uncontrolled hypertension (according to guidelines of the seventh report of the joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure [JNC-7]); (Chobanian et al. 2003) 5) known

1  
2  
3  
4 coagulation abnormalities or current use of anticoagulative medication other than aspirin; or 6)  
5  
6 any condition affecting documentation or follow-up.  
7

8  
9  
10 During the study enrollment period, high-risk PDR was identified in one eye of 16  
11 patients (2 patients presented with conditions that could affect documentation or follow-up and  
12 were excluded), and in both eyes of 8 patients based on clinical examination and confirmed on  
13 fluorescein angiography. If both eyes were eligible for the study, the eye with worse visual acuity  
14 was selected to receive the laser treatment combined with intravitreal bevacizumab.  
15  
16  
17

18  
19 At baseline, each patient received a detailed ophthalmologic examination including  
20 measurement of the logarithm of the minimum angle of resolution (logMAR) ETDRS BCVA  
21 according to a standardized refraction protocol (using modified ETDRS charts 1, 2, and R), as  
22 well as applanation tonometry, undilated and dilated slit lamp biomicroscopic examinations  
23 (including lenticular status using the Lens Opacities Classification System III),(Chylack et al.  
24 1993) and indirect funduscopy examination. Stereoscopic digital color fundus photography and  
25 fluorescein angiography were performed using two fundus camera systems (ADS 1.5; Opto, São  
26 Carlos, Brazil, and TRC-50IA/IMAGEnet; Topcon, Tokyo, Japan).  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

### 39 **Treatment Assignment**

40 All patients received one PRP session, which was performed in two episodes (at week 1 and week  
41 3) according to ETDRS guidelines (ETDRS 1987). Six to eight hundred 500 $\mu$ m spots were  
42 performed per episode, at the discretion of the treating investigator. If both eyes presented with  
43 high-risk PDR, one episode of PRP was administered in each eye, sequentially, at the same day.  
44  
45 Patients (n = 14) presenting with high-risk PDR in one eye were randomly assigned (1:1) to  
46 receive PRP alone (n = 7 eyes) or PRP plus intravitreal bevacizumab (n = 7 eyes). For patients (n  
47 = 8) presenting with high-risk PDR in both eyes, the eye with worse BCVA was selected to  
48 receive PRP plus intravitreal bevacizumab (n = 8 eyes) and the fellow eye was treated with PRP  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 alone (n = 8 eyes). For the fifteen eyes selected to receive the combined treatment (PRP plus  
5  
6 intravitreal bevacizumab), one intravitreal injection of 1.5 mg (0.06 mL) of bevacizumab was  
7  
8 performed ~60 minutes after the completion of the second laser episode of the PRP session (week  
9  
10 3) by a single retinal specialist (RJ). Bevacizumab was injected into the vitreous cavity via a 29½  
11  
12 gauge needle inserted through the inferotemporal pars plana 3.0 – 3.5 mm posterior to the limbus  
13  
14 using topical proparacaine drops under sterile conditions (eyelid speculum and povidone-iodine).  
15  
16 Patients were instructed to instill one drop of 0.3% ciprofloxacin into the injected eye four times  
17  
18 daily for 1 week after the procedure.  
19  
20  
21  
22  
23

#### 24 Follow-up Examinations and Outcome Measures

25  
26 Patients were scheduled for follow-up examinations at weeks 4, 9 (±1), and 16 (±2). The exact  
27  
28 same procedures performed at baseline were performed at each study visit. Systemic and local  
29  
30 adverse events were monitored throughout the study, including changes in intraocular pressure  
31  
32 and lens status.  
33

34  
35 Two measures were used to evaluate the short-term effects of bevacizumab: 1) the change  
36  
37 in logMAR BCVA, and 2) the total area (measured in mm<sup>2</sup>) of fluorescein leakage from active  
38  
39 NVs (NVD and/or NVE). When there was more than one site of active NVs, all sites were  
40  
41 considered for analysis.  
42  
43  
44

#### 45 Statistical Analysis

46  
47 To study the effect of both treatments (PRP and PRP plus bevacizumab) on BCVA and total area  
48  
49 of active leaking NVs at different periods of the study, an analysis of variance was employed  
50  
51 (split-plot design), considering the group factor as the main effect (PRP and PRP *plus*), and the  
52  
53 four periods (including baseline) as the sub-plot factor. Tukey's test was used for multiple  
54  
55 comparisons at 5% level of significance ( $P < 0.05$ ).  
56  
57  
58  
59  
60

## RESULTS

All 22 patients completed the 16-week follow-up evaluation. Patients' demographics are summarized in Table 1. There were no significant differences between both groups regarding gender, age, or laterality. Fourteen patients with unilateral high-risk PDR were randomly assigned to receive either PRP or PRP plus intravitreal bevacizumab, and eight patients with bilateral high-risk PDR had the eye with worse BCVA included in the "PRP plus" group while the fellow eye was included in the "PRP" group (total of 15 eyes in each treatment group ["PRP" and "PRP plus" groups]).

No serious drug-related adverse events were observed in the 15 eyes (15 patients) treated with bevacizumab in this study. Overall, the intravitreal injection procedure was well tolerated, and no clinical evidence of uveitis, endophthalmitis, or ocular toxicity was observed. Further, no significant changes in lens status or intraocular pressure were observed in any of the 15 injected eyes during the 16-week follow-up period. Minor local adverse events related to the treatment procedure, such as subconjunctival hemorrhage and foreign body sensation, were reported in 47% (7/15) and 13.5% (2/15) patients, respectively. These events were transient and resolved in all patients by 1 week after injection.

### Outcome Measures

No interaction between groups and periods was observed for BCVA values using two-way analysis of variance ( $F=1.23$ ;  $P=0.30$ ). There was no difference in BCVA between the two ("PRP" and "PRP plus") groups at different time points during the study period (Table 2, Figure 1). In addition, separate within-group analysis revealed no significant change in BCVA from baseline at any study period in both groups ( $P>0.05$ ).

The analysis of variance showed significant interaction between groups and periods considering the area of fluorescein leakage from active NVs ( $F=10.26$ ,  $P<0.001$ ). Figure 2

1  
2  
3  
4 shows a significant reduction in the total area of leakage from active NVs in “PRP *plus*” group at  
5 weeks 4, 9 ( $\pm 1$ ), and 16 ( $\pm 2$ ) when compared with the “PRP” group ( $P < 0.001$ ). Separate within-  
6 group analysis showed significant reduction in the total area of leakage from active NVs in the  
7 “PRP *plus*” group at weeks 4, 9 ( $\pm 1$ ), and 16 ( $\pm 2$ ) when compared with baseline. In the “PRP”  
8 group, changes from baseline in the total area of leakage from active NVs were not significant at  
9 any time point (Figure 2, Table 2).  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

## 18 DISCUSSION

19 The results of the current study suggest that, in the short term, the combination of intravitreal  
20 bevacizumab with PRP may be associated with a higher rate of regression of active leaking NVs  
21 than PRP alone in patients with high-risk PDR. Considering the previously observed effects of  
22 intravitreal bevacizumab in monotherapy in the setting of diabetic retinopathy, (Avery 2006a;  
23 Avery et al. 2006b; Mason et al. 2006) such an outcome is not surprising, particularly considering  
24 the first 6 weeks after intravitreal bevacizumab injection. However, about 60% of patients with  
25 PDR respond to PRP with regression of new vessels within 3 months (12 weeks) of treatment  
26 using ETDRS guidelines (ETDRS Research Group 1987; Vander et al. 1991). Since these  
27 guidelines were employed for PRP treatments performed by a single experienced retina specialist,  
28 the most probable reason for the limited rate of decreased leakage from active NVs in the PRP  
29 group might be poor glycemic control and somewhat more aggressive behavior of diabetic  
30 retinopathy in more pigmented Latin individuals. In fact, just one patient in the PRP *plus* group  
31 had HbA1C rate below 7%. Moreover, in contrast to the ETDRS, the population of the current  
32 study was mostly composed of Hispanic whites and black individuals which, as demonstrated by  
33 Emanuele et al, (Emmanuele et al. 2005) may be associated with higher diabetic retinopathy  
34 severity scores than non-Hispanic whites.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

No difference in BCVA existed between both groups throughout the 16-week follow-up interval of the study. In both groups, BCVA remained relatively stable and did not differ from baseline. In contrast, our previous study on persistent new vessels (Jorge et al. 2006), as well as studies including patients with PDR performed by other investigators (Avery et al. 2006b; Haritoglu et al. 2006; Mason et al. 2006; Spaide & Fisher, 2006), reported a significant improvement in BCVA after intravitreal anti-angiogenic treatment. This difference may be explained by clearing of pre-existing pre-retinal or vitreous hemorrhage and improvement in diabetic macular edema (Jorge et al. 2006; Spaide & Fisher, 2006). Recent studies using intravitreal bevacizumab or ranibizumab have shown reduction in central macular thickness and improvement in visual acuity for patients with diabetic macular edema and it is well known that PRP can be associated with worsening of pre-existing macular edema (Chun et al. 2006; Haritoglou et al. 2006). In the current study, however, the possible effects of intravitreal bevacizumab in this clinical scenario could not be evaluated because no patient had clinically significant macular edema at baseline and no significant change was verified at the short term, as per clinical and fluorescein angiography evaluations.

No difference in intraocular pressure and lens grading score was encountered between the two groups throughout the study, as well as no significant change on intraocular pressure and lens grading score was observed at any study period as compared with baseline in either group. The results of the current study are consistent with data from other studies regarding no apparent association between intravitreal bevacizumab injection and increase in intraocular pressure, cataract development/progression, or an increased rate of endophthalmitis related to the study drug (Avery et al. 2006b; Chun et al. 2006; Iturralde et al. 2006; Jorge et al. 2006; Mason et al. 2006).

In conclusion, whilst no difference in BCVA was observed, the combination of intravitreal bevacizumab injection with PRP was associated with a higher rate of regression of

1  
2  
3  
4 active leaking NVs than PRP alone in patients with high-risk PDR in the short term. Further  
5  
6 studies are needed to determine whether the addition of intravitreal bevacizumab to PRP may  
7  
8 delay or prevent the occurrence of associated vision-threatening complications such as vitreous  
9  
10 hemorrhage and tractional retinal detachment in the long term.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review



## REFERENCES

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Adamis AP, Altaweel M, Bressler NM, et al (2006): Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. *Ophthalmology* 113: 23-28.

Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al (1994): Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445-450.

Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, et al (1996): Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 114: 66-71.

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al (1994): Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480-1487.

Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, et al (1995): Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10457-10461.

Avery RL (2006a): Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 26: 352-354.

Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, et al (2006b): Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 113: 1695.e1-15.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al (2003): National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289: 2560-2572. Erratum in: *JAMA* (2003) 290: 197.



Chylack LT, Wolfe JK, Singer DM, et al (1993): The lens opacities classification system

III. Arch Ophthalmol 111: 831-836.

Chun DW, Heier JS, Topping TM, et al (2006): Pilot study of multiple intravitreal injections of ranibizumab in patients with center-involving clinically significant diabetic macular edema. Ophthalmology 113: 1707-1712.

Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M, et al (2005): A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. Ophthalmology 112: 1747-1757.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1987): Techniques for scatter and local photocoagulation treatment of diabetic retinopathy: ETDRS Report number 3. Int Ophthalmol Clin 27: 254-264.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1991a). Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Ophthalmology 98:766-785.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1991b). Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. Ophthalmology 98:823-833.

Emmanuele N, Sacks J, Klein R, et al (2005): Veterans affairs diabetes trial group. Diabetes Care 28: 1954-1958.

Flynn HW Jr, Chew EY, Simons BD, et al (1992): Pars plana vitrectomy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study. ETDRS report number 17. Ophthalmology 99: 1351-1357.

Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 285: 1182-1186.

Haritoglou C, Kook D, Neubauer A, et al (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema. Retina 26: 999-1005.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Inurralde D, Spaide RF, Meyerle CB, et al (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: A short-term study. *Retina* 26: 279-284.

Jorge R, Costa RA, Calucci D, et al (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study). *Retina* 26: 1006-1013.

Klein R (1992): Retinopathy In a population-based study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 90: 561-594.

Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, et al (1994): Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 112: 1476-1482.

Mason JO, Nixon PA, White MF (2006): Intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) as adjunctive treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 142: 685-688.

Shimura M, Yasuda K, Nakazawa T, et al (1994): Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445-450.

Spaide RF, Fisher YL (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 26: 275-278.

The diabetic retinopathy study Research Group (1979). Four risk factors for severe visual loss in diabetic retinopathy. The third report from the Diabetic Retinopathy Study. *Arch Ophthalmol* 97: 654-655.

Vander JF, Duker JS, Benson WE, et al (1991): Long-term stability and visual outcome after favorable initial response of proliferative diabetic retinopathy to panretinal photocoagulation. *Ophthalmology* 98: 1575-1579.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Table 1. Patient Demographics

Variable	Group	
	PRP <sub>plus</sub>	PRP
<b>Age (years)</b>		
Mean	54.06	51.4
± 1 SD	11,74	10,65
<b>Gender (n, %)</b>		
Male	11 (73.3)	8 (53.4)
Female	4 (26.7)	7 (46.6)
<b>Race (n, %)</b>		
Black	4 (26.7)	4 (26.7)
White Hispanic	7 (46.6)	9 (60)
White Non-Hispanic	4 (26.7)	2 (13.3)
<b>Duration of diabetes (years)</b>		
Mean	17.3	18.9
± 1 SD	7.26	6.69
<b>Treatment regimen for diabetes (n, %)</b>		
No insulin	5 (33.3)	4 (26.7)
Insulin	10 (66.7)	11 (74.3)
<b>HbA1c (%)</b>		
Mean	9.56	9.67
± 1 SD	1.50	1.49

HbA1c = glycosylated hemoglobin; PRP = panretinal photocoagulation; PRP+ BEV= panretinal photocoagulation and intravitreal injection of 1.5 mg of bevacizumab; SD = standard deviation.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 2.** Mean best-corrected visual acuity and total area of active leaking new vessels throughout the study.

Study Period	PRP <i>plus</i>		PRP	
	BCVA (logMAR ± SEM)	Active NV (mm <sup>2</sup> ± SEM)	BCVA (logMAR ± SEM)	Active NV (mm <sup>2</sup> ± SEM)
Baseline	0.26 ± 0.07	11.15 ± 2.24	0.26 ± 0.05	15.31 ± 4.81
Week 04	0.28 ± 0.05	0.62 ± 0.53	0.27 ± 0.07	14.73 ± 4.82
Week 09	0.29 ± 0.04	0.67 ± 0.25	0.31 ± 0.06	14.26 ± 4.57
Week 16	0.29 ± 0.04	4.46 ± 1.09	0.31 ± 0.06	13.58 ± 4.29

BCVA = best-corrected visual acuity; logMAR = logarithm of minimum angle of resolution; NV = new vessels (area of leakage from active NVs); PRP = pan-retinal photocoagulation; PRP *plus* = panretinal photocoagulation plus intravitreal injection of 1.5mg of bevacizumab; SEM: standard error of the mean

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) best-corrected visual acuity (BCVA) (logMAR values  $\pm$  SEM) after pan-retinal photocoagulation (PRP) and after PRP plus intravitreal bevacizumab by study visit.

**Figure 2.** Total area of active leaking new vessels ( $\text{mm}^2 \pm$  SEM) after pan-retinal photocoagulation (PRP) and after PRP plus intravitreal bevacizumab by study visit (asterisks indicate within-group significant changes from baseline values;  $P < 0.05$ )

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

Figure 1

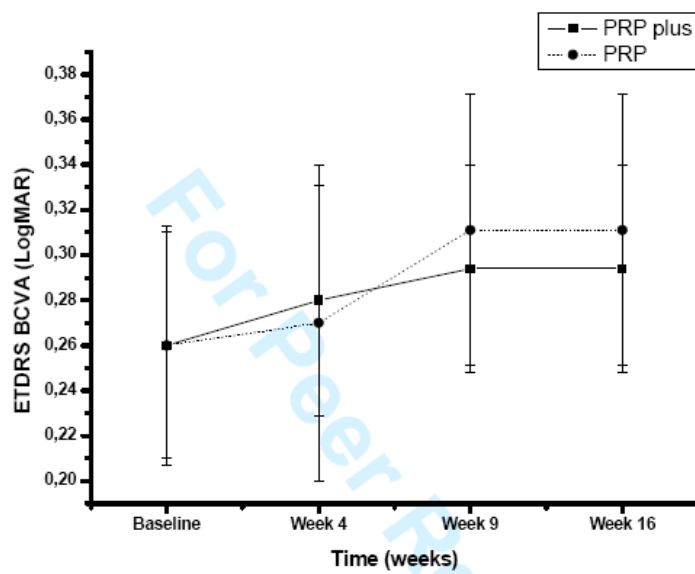
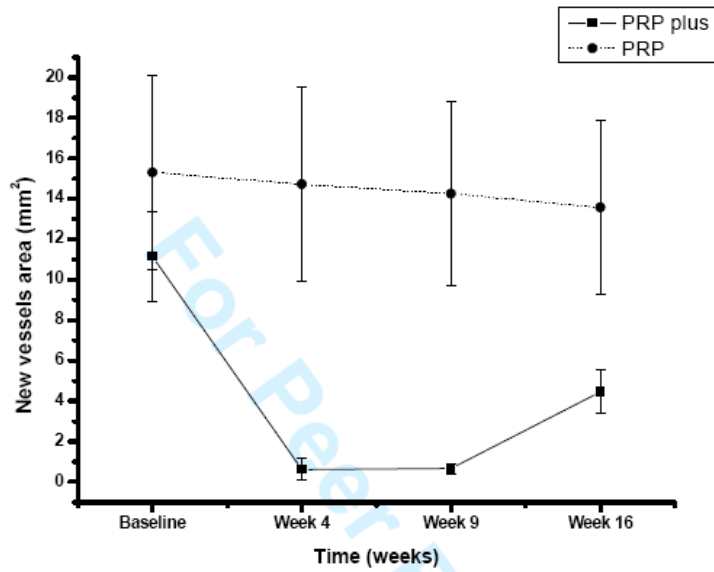
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure 2.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Após este segundo estudo, pôde-se verificar que a associação de Avastin à panfotocoagulação foi válida em curto prazo para induzir a regressão da neovascularização de retina e, em longo prazo, espera-se que sua complicação mais temida: descolamento de retina tracional também aconteça com menor freqüência no grupo que recebeu o tratamento antiangiogênico.

A contribuição mais interessante deste estudo, no entanto, não foi o resultado da associação do *LASER* ao Avastin, e sim, a constatação científica daquilo que antes era apenas uma impressão pessoal: os pacientes diabéticos do Sistema Único de Saúde, atendidos no Setor de Retina e Vítreo do HCFMRP-USP, têm um perfil de resposta a panfotocoagulação completamente diferente daquele reportado pelo ETDRS (*ETDRS Research Group*, 1991a; VANDER et al., 1991). Como comentado na discussão do trabalho acima, a panfotocoagulação praticamente não alterou o curso dos neovasos de retina nesses pacientes. Por esse motivo, estudos brasileiros são necessários, quando se refere à elaboração de parâmetros para tratamento de qualquer doença no Brasil.

Acredita-se que a resposta diferente apresentada pelos pacientes do IBEHI possa ser explicada por fatores étnicos e culturais: dos 22 pacientes do SUS incluídos nesse estudo, 22% (5/22) possuíam níveis de hemoglobina glicosilada abaixo de 9,6%, enquanto em estudos americanos como o ETDRS, o valor da hemoglobina glicosilada basal era menor que 9,6% em 50% dos pacientes. Também no ETDRS, a maioria dos pacientes era composta por brancos não-hispânicos: 2077 brancos não-hispânicos, 330 negros, 220 brancos hispânicos, 17 asiáticos, 10 nativos do Alaska ou índios; *ETDRS Research Group*, 1998), enquanto que, no IBEHI, houve predomínio de



pacientes hispânicos e negros. De fato, de acordo com achados de Emanuele et al. (2005), mesmo nos EUA, a gravidade da retinopatia é maior em brancos hispânicos do que em não-hispânicos, como comentado na discussão do trabalho acima.

### **3 BEVACIZUMABE E GLAUCOMA NEOVASCULAR**

Além de se estudar a neovascularização de retina, também procurou-se associação com o Setor de Glaucoma da Divisão de Oftalmologia do HCFMRP-USP e, junto com ele, resolver mais uma complicação do estímulo angiogênico secundário à retinopatia diabética: a neovascularização de ângulo iridocorneano e o glaucoma neovascular. Para tal, elaborou-se estudo prospectivo em que pacientes com retinopatia diabética e neovasos de íris ou ângulo, com ou sem hipertensão ocular, seriam submetidos à injeção intravítrea de bevacizumabe. Desse estudo, já se publicou um dos primeiros casos no qual houve controle em curto prazo da pressão intra-ocular e completa regressão dos vasos da íris uma semana após injeção intravítrea de 1,5mg de bevacizumabe. Foi o primeiro relato brasileiro do uso de bevacizumabe para regressão de neovasos de íris e de ângulo em pacientes com retinopatia diabética, publicado no periódico *Acta Ophthalmologica Scandinavica* e apresentado a seguir:

**3.1 SHORT-TERM RESULTS OF  
INTRAVITREAL BEVACIZUMAB (AVASTIN) ON ANTERIOR SEGMENT  
NEOVASCULARIZATION IN NEOVASCULAR GLAUCOMA**

*Correspondence:*

Dr U.H.M. Spandau  
 Universitäts-Augenklinik  
 Theodor-Kutzer-Ufer 1-3  
 68167 Mannheim  
 Germany  
 Tel: + 49 621 383 2242/2652  
 Fax: + 49 621 383 3803  
 Email: Ulrich.Spandau@augen.ma.uni-heidelberg.de

### Short-term results of intravitreal bevacizumab (Avastin) on anterior segment neovascularization in neovascular glaucoma

Jayter Silva Paula,<sup>1</sup> Rodrigo Jorge,<sup>2</sup> Rogério Alves Costa,<sup>2</sup> Maria de Lourdes V. Rodrigues<sup>1</sup> and Ingrid U. Scott<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Glaucoma, Retina and Vitreous Section, Department of Ophthalmology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Retina Diagnostic and Treatment Division (UDAT), Hospital of Olhos Araraquara, SP, Brazil

<sup>3</sup>Departments of Ophthalmology and Health Evaluation Sciences, Penn State College of Medicine, Hershey, Pennsylvania, USA

doi: 10.1111/j.1600-0420.2006.00731.x

Editor,

Ischaemic retinopathies may lead to neovascular glaucoma (NVG) due to the growth of blood vessels on the iris surface and anterior chamber angle. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most studied angiogenic peptide in ischaemic retinal diseases and NVG (Tripathi et al. 1998; Michels et al. 2005). Intravitreal injection of bevacizumab, an anti-VEGF agent, for the treatment of neovascular diseases has shown encouraging results (Michels et al. 2005; Spaide & Fisher 2006). We report the effects of an intravitreal injection of 1.5 mg bevacizumab (Avastin; Genentech, Inc., San Francisco, CA, USA) on iris and angle neovascularization in a patient with NVG secondary to diabetic retinopathy.

A 69-year-old white woman presented with decreased visual acuity in

both eyes of 1 year's duration and severe pain in the right eye for 1 day. The patient reported a history of diabetes and systemic hypertension of at least 20 years' duration. Visual acuity was hand motion in the right eye and light perception in the left. Slit-lamp examination demonstrated 8 clock hours of iris neovascularization in the right eye. Intraocular pressure (IOP) was 40 mmHg in the right eye and 14 mmHg in the left. Gonioscopy demonstrated 10 clock hours of angle neovascularization without synechiae in the right eye. Indirect ophthalmoscopy showed vitreous haemorrhage associated with retinal neovascularization in both eyes. Vitreous haemorrhage precluded the application of panretinal laser photocoagulation in either eye. The patient was treated with timolol and brimonidine, both b.i.d. in the right eye, and acetazolamide (750 mg/day). One day after presentation, IOP was 23 mmHg in the right eye. The patient was offered pars plana vitrectomy with endophotocoagulation in the right eye. The patient declined surgery and was offered an off-label intravitreal be-

vacizumab injection in the right eye. After extensive discussion, the patient gave written informed consent for off-label intravitreal bevacizumab injection (1.5 mg) in the right eye.

One day after intravitreal injection of bevacizumab, the pain in the right eye had resolved, and examination demonstrated partial regression of the iris and angle neovascularization. One week later, iris fluorescein angiography demonstrated complete regression of the iris and angle neovascularization and absence of fluorescein leakage (Fig. 1). Gonioscopy demonstrated complete regression of the iris and angle neovascularization (Fig. 2). These findings have been stable for 8 weeks post-treatment, and the IOP at 8 weeks post-injection was 19 mmHg with the same medications. Vitreous haemorrhage has cleared substantially and there is no leakage from retinal new vessels on fluorescein angiography. The last noted visual acuity in the right eye was counting fingers at 3 metres.

The standard treatment of NVG associated with ischaemic retinopathy includes retinal ablation (Sivak-Call-

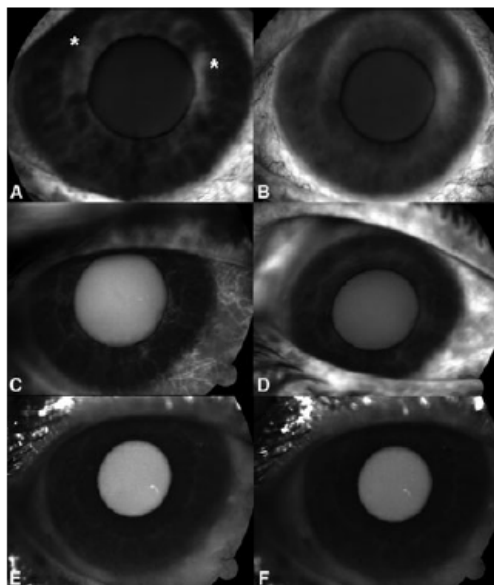


Fig. 1. (A) Early and (B) late phase fluorescein angiographs showing new iris vessels (asterisks). (B, C) One week after intravitreal injection of bevacizumab, the regression of the new vessels can be seen. (E, F) Iris angiograph showing normal iris angiography, 8 weeks after the procedure.

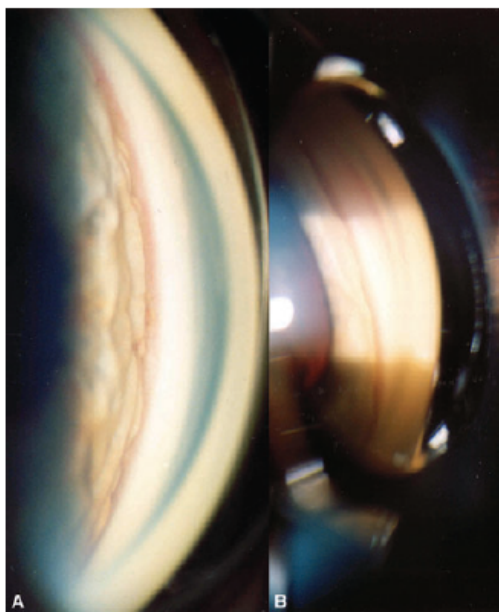


Fig. 2. Gonioscopy examination before (A) and 1 week after (B) intravitreal injection of bevacizumab. Note the regression of angle neovascularization.

cott et al. 2001). Although retinal ablation has an efficacy of about 85% using cryosurgery or laser surgery, NVG has been reported to persist in 1.6% of treated eyes (Fernandez-Vigo et al. 1997). A pharmacological treatment directed against the angiogenic stimulus for neovascularization may represent an alternative or an adjunctive treatment for ischaemic retinal diseases. In fact, promising results have been reported recently for intravitreal bevacizumab in iris neovascularization (Avery 2006; Davidorf et al. 2006).

The current case demonstrates that intravitreal bevacizumab injection may be associated with rapid regression of iris and angle neovascularization in the setting of NVG associated with diabetic retinopathy. A single injection was associated with medically controlled IOP for at least 8 weeks.

Although only a single bevacizumab injection was administered in this case, repeated injection(s) may be needed for longer-term treatment. Intravitreal bevacizumab injections may represent a useful alternative treatment for patients with NVG in whom inadequate visualization precludes treatment by retinal photocoagulation.

## References

- Avery RL (2006): Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 26: 352–354.
- Davidorf FH, Mouser JG & Derick RJ (2006): Rapid improvement of rubeosis iridis from a single bevacizumab (Avastin) injection. *Retina* 26: 354–356.
- Fernandez-Vigo J, Castro J & Macarro A (1997): Diabetic iris neovascularization. Natural history and treatment. *Acta Ophthalmol Scand* 75: 89–93.
- Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN & Venkatraman AS (2005): Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration. Twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 112: 1035–1047.
- Sivak-Calleot JA, O'Day DM, Gass DM & Tsai JC (2001): Evidence-based recommendations for the diagnosis and treatment of neovascular glaucoma. *Ophthalmology* 108: 1767–1776.
- Spaide RF & Fisher YL (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous haemorrhage. *Retina* 26: 275–278.
- Tripathi RC, Li J, Tripathi BJ, Chalam KV & Adamis AP (1998): Increased level of vascular endothelial growth factor in aqueous humour of patients with neovascular glaucoma. *Ophthalmology* 105: 232–237.

### Correspondence:

Jayter Silva Paula MD, PhD  
Department of Ophthalmology  
School of Medicine of Ribeirão Preto  
University of São Paulo  
Avenue Bandeirantes 3900  
São Paulo 14049-900  
Brazil  
Tel: + 55 16 602 2499  
Fax: + 55 16 602 2860  
Email: jayterdepaula@yahoo.com.br

## Subconjunctival crystals in paediatric blepharokeratoconjunctivitis

Jodhbir S. Mehta, Mandeep S. Sagoo and Steven J. Tuft

Cornea and External Disease Service, Moorfields Eye Hospital, London, UK

doi: 10.1111/j.1600-0420.2006.00665.x

### Editor,

The diagnosis of paediatric blepharokeratoconjunctivitis, which is sometimes an early manifestation of paediatric ocular rosacea, is often delayed and the condition may be confused initially with allergic conjunctivitis (Erzurum et al. 1993). Lack of uniform diagnostic criteria, failure to recognize minor cutaneous findings, and the fact that ocular symptoms may precede skin disease all contribute to this delay (Nazir et al. 2004). We describe the presence of subconjunctival crystalline deposits in three patients. There was no personal or family history of atopy in any patient, and examination of the skin was unremarkable, with no erythema or papules on the cheeks or forehead. Treatment of all three patients included lid margin scrubs, oral erythromycin 125 mg daily for 4–6 weeks, topical steroid (fluorometholone 0.1% or prednisolone 0.1%), and topical antibiotic ointment administered at night (chloramphenicol or fucidic acid). All three improved symptomatically although the crystalline deposits did not resolve over follow-up of 1 year.

## Case 1

The first patient was a 12-year-old Asian boy with a 4-year history of

O relato acima adiciona 2 dados importantes à literatura. O primeiro é a capacidade de 1,5mg de bevacizumabe intravítreo induzir rápida regressão de neovasos de íris e principalmente de neovasos do ângulo iridocorneano. De fato, Avery e Davidorf já haviam demonstrado a regressão dos neovasos de íris após a injeção intravítrea de bevacizumabe, em março de 2006 (AVERY, 2006; DAVIDORF et al., 2006). No entanto, o estudo de Silva Paula et al. (2006) mostrou de forma contundente, por meio de documentação fotográfica, a regressão dos neovasos de íris, que foi apenas comentada no trabalho de Davidorf. A documentação da regressão dos neovasos de ângulo impressionou o editor do Acta Ophthalmologica, que a colocou na capa da edição de agosto de 2006.

A segunda contribuição importante do presente relato foi mostrar que a rápida regressão do neovaso de ângulo, após bevacizumabe intravítreo, em pacientes diabéticos com glaucoma neovascular, pode contribuir para o controle da pressão intraocular em curto prazo (8 semanas). Em outras palavras, o agente anti-VEGF ajuda a estabilizar a pressão intra-ocular, dando tempo para que seja realizada maior ablação da retina isquêmica, tanto por meio de crioterapia, como por fotocoagulação a *LASER*. O bevacizumabe é, portanto, importante terapêutica adjuvante no tratamento do glaucoma neovascular.

## 4 BEVACIZUMABE E EDEMA MACULAR DIABÉTICO

Além de bloquear a parte de proliferação vascular da retinopatia diabética, foi praticamente automática a idéia de tratar o edema macular, sabendo que: 1) o VEGF é potente indutor da permeabilidade vascular, sendo aproximadamente 50 000 vezes mais potente que a histamina (SENGER et al., 1990); 2) Rosenfeld pioneiramente mostrou melhora do edema macular em um caso de oclusão de veia central da retina (ROSENFELD et al., 2005a); 3) Cunningham et al. Mostraram, em outubro de 2005, que o pegaptanibe, outro agente bloqueador de VEGF, melhorava a espessura macular e a acuidade visual de pacientes com edema macular diabético. Portanto, além dos trabalhos envolvendo retinopatia diabética proliferativa e geração de neovasos, apresentados anteriormente, também se elaborou estudo para verificar se o bevacizumabe poderia levar à melhora dos casos de edema macular diabético, que não obtiveram melhora após tratamento convencional com fotocoagulação a *LASER* focal. A esses casos de edema macular denomina-se: edema macular diabético refratário (refratário ao tratamento a *LASER*) (BONINI-Filho et al., 2005).

No final do ano de 2005, restavam 3 opções para casos de edema macular refratário: **1) injeção intravítrea de triancinolona**, tratamento *Off Label* (não indicado na bula), porém já consagrado na literatura com mais de 5 anos de estudo e 120 publicações na literatura de acordo com consulta no *PubMed* em setembro de 2005 (termos pesquisados: *intravitreal triamcinolone and diabetic retinopathy*); **2) vitrectomia via *pars plana***, opção mais invasiva com resultados contraditórios em termos de melhora visual de acordo com a literatura (PATEL et al., 2006; YANYALI et al., 2005) e **3) observação**, sem novas intervenções, o que, na maioria das vezes, condenava o

paciente à cegueira legal, pois o edema crônico da mácula leva à formação de cistos que se coalescem e culminam com um defeito total da retina: buraco macular. Portanto, mais uma vez idealizou-se o primeiro estudo de uma doença com um novo fármaco, iniciando-se pelos casos que já haviam sido submetidos aos tratamentos tradicionais sem sucesso e respeitando a opinião do paciente pelas opções remanescentes. Para os pacientes com edema macular diabético refratário que não queriam apenas a observação, porém, não queriam se arriscar muito com a vitrectomia via *pars plana*, ofereceu-se o tratamento consagrado pela literatura (injeção de triancinolona intravítrea), ou um novo tratamento também baseado em injeção intravítrea (bevacizumabe), também menos invasivo que a vitrectomia via *pars plana*.

Elaborou-se, portanto, um estudo fase I para se comparar o uso intravítreo de bevacizumabe *versus* uso intravítreo de triancinolona para pacientes com edema macular diabético refratário. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, no início do mês de abril de 2006, e iniciado no mesmo mês, tendo sido finalizado um ano após, conforme *pro forma* em PDF, enviado ao jornal *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.



**4.1 INTRAVITREAL TRIAMCINOLONE *VERSUS*  
BEVACIZUMAB FOR TREATMENT OF REFRACTORY DIABETIC MACULAR  
EDEMA (IBEME STUDY)**

**INTRAVITREAL TRIAMCINOLONE VERSUS BEVACIZUMAB FOR  
TREATMENT OF REFRACTORY DIABETIC MACULAR EDEMA  
(IBEME STUDY)**

*Leticia Paccola,<sup>1</sup> Rogério A. Costa,<sup>1,2</sup> Marco S. Folgosa,<sup>1</sup> José C. Barbosa,<sup>3</sup>*

*Ingrid U. Scott,<sup>4</sup> Rodrigo Jorge<sup>1</sup>*

From the <sup>1</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil; <sup>2</sup>UDAT – Macular Imaging & Treatment Division, Hospital de Olhos de Araraquara, Araraquara, SP, Brazil; <sup>3</sup>Exact Sciences Department, São Paulo State University, Jaboticabal, SP, Brazil; and <sup>4</sup>Departments of Ophthalmology and Public Health Sciences, Penn State College of Medicine, Hershey, PA, USA.

Corresponding author:

Prof. Dr. Rodrigo Jorge. Docente e Chefe do Setor de Retina e Vítreo.

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Avenida Bandeirantes 3900. Ribeirão Preto-SP 14049-900 Brazil.

Tel./Fax: 55 (16) 602-2860. E-mail: [rjorge@fmrp.usp.br](mailto:rjorge@fmrp.usp.br)

Supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant n° 302940/2005-7; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant n° 2006/55080-5.

Clinical Trial register: NCT00468351

Disclosure: **L. Paccola**, None; **R. Costa**, None; **M. Folgosa**, None; **J. Barbosa**, None;

**I. Scott**, None; **R. Jorge**, None.

Character/Word count: **Title**, 98; **Abstract**, 248; **Text**, 2492.

**ABSTRACT**

**Purpose:** To compare the morphological and visual acuity outcomes associated with a single intravitreal injection of triamcinolone acetonide versus bevacizumab for the treatment of refractory diffuse diabetic macular edema.

**Methods:** Twenty-eight patients were randomly assigned to receive a single intravitreal injection of either 4 mg/0.1cc of triamcinolone acetonide or 1.5 mg/0.06cc of bevacizumab. Comprehensive ophthalmic evaluation was performed at baseline and at weeks 1, 4, 8±1, 12±2 and 24±2 after treatment. Main outcome measures included central macular thickness measured with optical coherence tomography (OCT) and best-corrected Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) visual acuity.

**Results:** Twenty-six patients (26 eyes) completed all study visits (2 patients missed 2 consecutive study visits). Central macular thickness was significantly reduced in the intravitreal triamcinolone group when compared with the bevacizumab group at weeks 4, 8, 12 and 24 ( $P<0.05$ ). LogMAR best-corrected visual acuity was significantly higher at weeks 8 (0.69; ~20/100<sup>+1</sup>) and 12 (0.74; 20/100<sup>-2</sup>) in the intravitreal triamcinolone group when compared with the bevacizumab group (weeks 8 [0.83; ~20/125<sup>-1</sup>] and 12 [0.86; 20/160<sup>+2</sup>]) ( $P<0.05$ ). Significant change from baseline in mean intraocular pressure (mm Hg) was seen at week 4 (+2.25) only in the intravitreal triamcinolone group ( $P<0.0001$ ). No patient had observed cataract progression during the study.

**Conclusions:** Changes in central macular thickness and vision observed after a single intravitreal treatment suggest that triamcinolone may be superior to bevacizumab for the management of refractory diffuse diabetic macular edema in the short term. Further studies are required to confirm our preliminary findings.

Macular edema is the most common cause of visual impairment in patients with diabetic retinopathy.<sup>1</sup> Based on observations of the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Group, diabetic macular edema (DME) is classified as “clinically significant” if well-defined specific clinical features described elsewhere<sup>2</sup> were seen associated to retinal thickening at or within 1 disc diameter of the center of the macula or definitive hard exudates in this region. For this subgroup of patients, focal/grid laser photocoagulation is associated with a 50% reduction in moderate vision loss.<sup>2</sup> However, the infrequently observed visual acuity improvement as well as the frequent recurrence or persistence of DME after appropriate laser treatment, particularly in eyes presenting with angiographically diffuse macular edema,<sup>2,3</sup> has led investigators to seek alternative treatments for the management of DME.

Amongst treatments currently under investigation for DME, intravitreal injection of triamcinolone acetonide<sup>4-11</sup> and of antiangiogenic agents such as bevacizumab,<sup>12,13</sup> pegaptanib,<sup>14</sup> and ranibizumab,<sup>15</sup> have been reported to be associated with favorable remodeling of the macular architecture and visual acuity improvement in DME.<sup>6-15</sup> In the view of these promising preliminary results, we conducted a randomized, prospective study to compare the morphological and visual acuity outcomes associated with a single intravitreal injection of triamcinolone acetonide versus bevacizumab in the management of refractory diffuse DME.

## METHODS

The study protocol adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the local Institutional Review Board, and all participants gave written informed consent before entering into the study. All patients evaluated at the Retina Section of the Department of Ophthalmology, School of Medicine of Ribeirão Preto with a diagnosis of refractory DME in at least one eye between April 2006 and September 2006 were invited to participate in the study. Throughout the study, measurement of best-corrected ETDRS visual acuity (BCVA) as well as

central macular thickness measured using third generation optical coherence tomography (OCT) were performed prior to other study procedures by masked certified examiners. Ophthalmic evaluation, fundus photography and fluorescein angiography were performed by two retina specialists (LP and MF) who were aware of treatment assignment. Study data were collected, interpreted and analyzed by two other masked investigators (RAC and JCB).

### **Patient Eligibility and Baseline Evaluation**

Patients were included if they had: 1) refractory DME (defined herein as the presence of “clinically significant macular edema” [as per ETDRS criteria]<sup>2</sup> by biomicroscopic evaluation which has persisted despite at least one session of macular laser photocoagulation performed at least 3 months prior) *and* diffuse fluorescein leakage involving the foveal center and most of the macular area on fluorescein angiography, 2) logarithm of minimum angle of resolution (LogMAR) ETDRS BCVA (Snellen equivalent) of 0.3 (20/40) or worse, and 3) central macular thickness (CMT) greater than 300µm on OCT. Exclusion criteria were: 1) aphakic or pseudophakic eyes, 2) glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) level above 10%, 3) history of glaucoma or ocular hypertension (defined as an intraocular pressure higher than 22 mm Hg), 4) an ocular condition (other than diabetes) that, in the opinion of the investigator, might affect macular edema or alter visual acuity during the course of the study (e.g., retinal vein occlusion, uveitis or other ocular inflammatory disease, neovascular glaucoma, Irvine-Gass Syndrome, etc.), 5) systemic corticosteroid therapy, 6) history of thromboembolic event (including myocardial infarction or cerebral vascular accident); 7) major surgery within the prior 6 months or planned within the next 28 days; 8) uncontrolled hypertension (according to guidelines of the seventh report of the joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure [JNC-7]);<sup>16</sup> 9) known coagulation abnormalities or current use of anticoagulative medication other than aspirin; or 10) any condition affecting follow-up or documentation.

Each patient received a detailed ophthalmologic examination including measurement of BCVA according to a standardized refraction protocol using a retroilluminated Lighthouse for the Blind distance visual acuity test chart (using modified ETDRS charts 1, 2, and R), as well as applanation tonometry, undilated and dilated slit lamp biomicroscopic examination (including grading of lens opacity using the Lens Opacities Classification System III),<sup>17</sup> indirect fundus examination, as well as color fundus photography and fluorescein angiography. Third generation OCT evaluation (Stratus<sup>®</sup> Tomographer, Model 3000, Carl Zeiss Ophthalmic Systems Inc., Humphrey Division, Dublin, CA) was also performed in all patients, and consisted of six linear 6.00 mm scans orientated at intervals of 30 degrees and centered on the foveal region. In order to optimize accuracy of OCT data, automatic delineation of the inner and outer boundaries of the neurosensory retina generated by OCT built-in software was verified for each of the six scans using the “retinal thickness (single eye)” analyses protocol.<sup>18,19</sup> For this study, CMT values (defined as the average thickness of a central macular region 1000 µm in diameter centered on the patient’s foveola) automatically generated by built-in OCT3 software using “retinal thickness (both eyes)” analysis protocol was used. Good reproducibility of these measurements using this method and its feasibility to monitor macular morphological changes in diabetic eyes have been described elsewhere.<sup>9,20,21</sup>

A total of 28 patients with refractory diffuse DME in at least one eye based on clinical examination and fluorescein angiography were identified. If both eyes were eligible for treatment, the eye with worse visual acuity was included. Twenty-six of the 28 patients were ultimately included in the analyses (2 patients missed 2 consecutive study visits and were excluded from analyses).

### **Treatment Assignment**

Each patient was randomly assigned to receive one intravitreal injection of either 4 mg/0.1cc of triamcinolone acetonide or 1.5 mg/0.06 cc of bevacizumab within 1 week of baseline.

Patients assigned to intravitreal triamcinolone constituted the “ITA” group and those assigned to intravitreal bevacizumab constituted the “IBe” group.

For ITA, 4 mg of preservative-free triamcinolone acetamide (Triamcinolona 40 mg/ml; Ophthalmos<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil) was used, and for IBe 0.06 ml (1.5 mg) of bevacizumab (Avastin<sup>®</sup> 100mg/4ml; Genentech Inc.; South San Francisco, CA) was injected into the vitreous cavity. All treatments in both groups were performed by the same retinal specialist (RJ) using topical anesthesia under appropriate sterile conditions, and 0.3% ciprofloxacin QID was used post-injection for 1 week.

#### **Follow-up Examinations and Outcome Measures**

Patients were scheduled for follow-up examinations at weeks 1, 4, 8 ( $\pm 1$ ), 12 ( $\pm 2$ ) and 24 ( $\pm 2$ ) after injection. At these visits, patients' BCVA was determined and they underwent complete ophthalmic examination using the same procedures as at baseline, with the exception of fluorescein angiography which was performed only at the final (week-24) follow-up visit.

Primary outcome measures used to compare the short-term effects of ITA with IBe were: 1) macular remodeling (that is, changes in CMT) on OCT, and 2) changes in BCVA from baseline. Secondary outcomes included the presence of local (such as changes in intraocular pressure [IOP] and cataract progression) and systemic adverse events, which were monitored throughout the study.

#### **Statistical Analysis**

To study the effect of both treatments at the various study follow-up visits, an analysis of variance was employed, with a split-plot design, considering the group factor as the main effect (group ITA and group IBe), and the six study visits (including baseline) as the sub-plot factor. Tukey's test was used for multiple comparisons at 5% level of significance ( $P < 0.05$ ).

## RESULTS

Between April 2006 and April 2007, twenty-six patients completed the 24-week study period (Figure 1). Twenty-one eyes ( $n = 10$ , ITA group;  $n = 11$ , IBe group) had proliferative diabetic retinopathy treated by panretinal photocoagulation at least 6 months before initial evaluation. Baseline characteristics by group are summarized in **Table 1**. There were no significant differences between the two treatment groups with regards to patient age, gender, or baseline characteristics, such as diabetic retinopathy level and number of prior laser surgeries for DME. Ten patients had refractory diffuse DME in both eyes, and the eye with worse visual acuity was selected for the study.

### Outcome Measures

The analysis of variance showed significant interaction between groups and study visits with regards to central macular thickness (CMT) measurements ( $F=2.61$ ;  $P=0.028$ ). **Figure 1** shows a significant reduction ( $P<0.01$ ) in CMT in the ITA group at weeks 4 ( $P=0.008$ ), 8 ( $P=0.006$ ), 12 ( $P<0.0001$ ), and 24 ( $P=0.024$ ) when compared with the IBe group. Separate within-group analysis showed significant change (reduction) in CMT values from baseline at weeks 4, 8, and 12 ( $P<0.0001$ ) in the ITA group, and at weeks 4 ( $P<0.0001$ ) and 8 ( $P=0.0004$ ) in the IBe group (**Figure 1; Table 2**).

Significant interaction between groups and study visits was also observed for BCVA ( $F=2.76$ ;  $P=0.022$ ). **Figure 2** shows significant improvement in BCVA in the ITA group when compared with the IBe group at weeks 8 ( $P=0.026$ ) and 12 ( $P=0.039$ ). Separate within-group analysis showed significant improvement in BCVA from baseline at weeks 4, 8 and 12 ( $P<0.001$ ) in the ITA group, and at week 4 ( $P=0.011$ ) in the IBe group (**Figure 2; Table 2**).

Significant interaction between groups and study visits was observed for IOP values using two-way analysis of variance ( $F=3.46$ ;  $P=0.006$ ). There was a significant increase in IOP in the ITA group when compared with the IBe group at weeks 1 ( $P<0.0001$ ), 4 ( $P<0.0001$ ), and 12



( $P=0.043$ ) (**Figure 3; Table 2**). Separate within-group analysis revealed a significant increase in IOP from baseline in the ITA group at week 4 ( $P<0.0001$ ); in the IBe group no significant change in IOP was observed at any study visit. During the 24-week study period, no cataract progression was observed in either the ITA or IBe group. No severe adverse event was observed throughout the study. No systemic or serious drug-related adverse events were observed. Both treatment procedures were well tolerated, and no clinical evidence of inflammation, uveitis, endophthalmitis, or ocular toxicity was observed.

## DISCUSSION

In the current study, a single intravitreal injection of triamcinolone acetonide was associated with a greater reduction in CMT in patients with refractory diffuse DME when compared with one intravitreal injection of bevacizumab in the short-term. Comparatively, a more favorable macular remodeling was observed with intravitreal triamcinolone compared with bevacizumab as soon as 4 weeks after treatment, and persisted up to week 24. Although somewhat greater favorable CMT changes were observed in patients treated with intravitreal triamcinolone than bevacizumab throughout the study period, the changes in vision were significantly different between the groups only at weeks 8 and 12. Therefore, the overall results of the current study suggest that one intravitreal injection of triamcinolone may be associated with greater beneficial effects on vision and macular remodeling than a single intravitreal injection of bevacizumab for the short term management of refractory diffuse DME.

Changes in CMT observed in the ITA group in the current study are consistent with those reported previously by our group in patients with refractory DME;<sup>10</sup> mean CMT reduction of 59% (182.93  $\mu\text{m}$ ) at 4 weeks<sup>10</sup> versus 38% (168  $\mu\text{m}$ ) in the current study, 30% (136.72  $\mu\text{m}$ ) at 12 weeks<sup>10</sup> versus 27% (121.92  $\mu\text{m}$ ) in the current study, and 12% (55.07  $\mu\text{m}$ ) at 24 weeks<sup>10</sup> versus 9.5% (42.25  $\mu\text{m}$ ) in the current study. Audren et al<sup>5</sup> reported 51% (289  $\mu\text{m}$ ), 52% (293  $\mu\text{m}$ ) and 20% (115.8  $\mu\text{m}$ ) reductions in mean macular thickness by 1, 3 and 6 months of follow-up, respectively,

after 4 mg intravitreal TA injection for refractory diffuse DME. Using the same intravitreal dosage of triamcinolone, Massin et al<sup>8</sup> also demonstrated short-term significant reduction in CMT. In the latter study, macular edema recurred and retinal thickness reduction was no longer significant 24 weeks after injection, similar to the findings in the present study (**Figure 1**).

Intravitreal bevacizumab was first reported as a treatment for macular edema related to central retinal vein occlusion.<sup>22</sup> Since then, there have been other reports of short term beneficial effect of anti-VEGF agents in reducing CMT and edema secondary to retinal vascular disease, including diabetic retinopathy.<sup>12-15,23,24</sup> More recently, Haritoglu et al reported significant macular thickness reduction 2 (15%), 6 (17%) and 12 weeks (25%) after repeated intravitreal bevacizumab injections.<sup>12</sup> We observed significant improvement in CMT at 4 (23%) and 8 (21%) weeks after a single 1.5 mg IBe injection.

Beneficial effects of intravitreal injection of TA compared with bevacizumab with respect to change in visual acuity were noted 8 and 12 weeks after injection. In the ITA group, visual acuity improvement from baseline was noted at weeks 4 (0.22 logMAR), 8 (0.24 logMAR) and 12 (0.19 logMAR). Similarly, previous reports have shown significant visual acuity improvements at the same study points after ITA injection,<sup>6,9,10</sup> whereas Massin et al reported only a trend towards improvement in visual acuity 3 months after intravitreal injection.<sup>7</sup> Regarding IBe injection, we verified significant improvement in mean visual acuity 4 weeks (0.14 logMAR, ~7 EDTRS letters) after IBe in comparison to baseline values. Haritoglu et al<sup>12</sup> reported a similar significant increase in visual acuity (0.11 logMAR, ~6 EDTRS letters) 6 weeks after treatment, when 70% of the patients had received at least two 1.25 mg IBe injections. On the other hand, a retrospective series by Arevalo et al<sup>12</sup> showed that 55.1% of patients improved  $\geq 2$  ETDRS lines (10 ETDRS letters) after 6 months of follow-up. However, this study did not include patients with refractory DME and IBe was used as a primary treatment. In addition, the retrospective nature of the study and lack of standardization regarding number of injections and anti-VEGF drug dosage make a comparison of the 6-month results difficult.

The risk of IOP elevation associated with ITA has been reported in previous studies.<sup>6,9</sup> In our study, there was a significant IOP increase from baseline observed at 4 weeks after the procedure in the ITA group. In addition, IOP in the ITA group was significantly elevated at weeks 4 and 8 in comparison with IBe group. Since baseline IOP values in both groups were similar ( $p=0.56$ ), it is important to point out that ITA has a higher risk of short term elevation of IOP when compared to IBe. Additionally, the incidence of cataract progression and glaucoma may well increase with longer follow-up and additional ITA treatments,<sup>6</sup> and surgery for steroid-induced cataract may worsen DME and make its management more complicated.<sup>25</sup> For this reason, IBe is an attractive treatment option for steroid-responders<sup>26</sup> and phakic patients. For these patients, we hypothesize that repeated IBe injections using a dosage higher than that used in the current study may be a reasonable alternative therapeutic option, as it may be associated with better VA and CMT outcomes without the adverse events of glaucoma and cataract progression.<sup>12</sup> Additional injection-related complications reported in other studies, such as conjunctival ulceration, retinal detachment, infectious or noninfectious endophthalmitis,<sup>14,27-29</sup> were not observed in the current study.

In conclusion, a single intravitreal injection of 4 mg of TA appears to be more effective for the short-term management of refractory diffuse DME than a single 1.5 mg IBe injection, but has the disadvantage of transient IOP elevation. Our results are limited due to such factors as small sample size and limited length of follow-up, and emphasize the need for further studies. Moreover, the potential benefits of TA or IBe, if any, over additional laser therapy for the management of refractory diffuse DME remains to be determined, particularly in the long-term.

## REFERENCES

1. Klein R, Klein BE, Moss SE. Visual impairment in diabetes. *Ophthalmology* 1984;91:1-9.
2. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 1. Photocoagulation for diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol* 1985;103:1796-1805.
3. Lee CM, Olk RJ. Modified grid laser photocoagulation for diffuse diabetic macular edema: long-term visual results. *Ophthalmology* 1991;98:1594-1602.
4. Jonas JB, Sofker A. Intraocular injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 2001;132:425-427.
5. Audren F, Lecleire-Collet A, Erginay A, et al. Intravitreal triamcinolone acetonide for diffuse diabetic macular edema: phase 2 trial comparing 4 mg vs 2 mg. *Am J Ophthalmol* 2006;142:794-799.
6. Martidis A, Duker J, Greenberg PB, et al. Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2002;109:920-927.
7. Jonas JB. Intravitreal triamcinolone acetonide for diabetic retinopathy. *Dev Ophthalmol* 2007;39:96-110.
8. Massin P, Audren F, Haouchine B, et al. Intravitreal triamcinolone acetonide for diabetic diffuse macular edema: preliminary results of a prospective controlled trial. *Ophthalmology* 2004;111:218-224; discussion 224-225.
9. Sutter FKP, Simpson JM, Gillies MC. Intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema that persists after laser treatment. *Ophthalmology* 2004;111:2044-2049.
10. Bonini-Filho MA, Jorge R, Barbosa JC, Calucci D, Cardillo JA, Costa RA. Intravitreal injection versus sub-Tenon's infusion of triamcinolone acetonide for refractory diabetic macular edema: a randomized clinical trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3845-3849.
11. Karacorlu M, Ozdemir H, Karacorlu S, Alacali N, Mudun B, Burumcek E. Intravitreal triamcinolone as a primary therapy in diabetic macular oedema. *Eye* 2005;19:382-386.

12. Haritoglou C, Kook D, Neubauer A, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema. *Retina* 2006;26:999-1005.
13. Arevalo JF, Fromow-Guerra J, Quiroz-Mercado H, et al. Primary intravitreal bevacizumab (Avastin) for diabetic macular edema: results from the Pan-American Collaborative Retina Study Group at 6-month follow-up. *Ophthalmology* 2007;114:743-750
14. Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M, et al. A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2005;112:1747-1757.
15. Chun DW, Heier JS, Topping TM, et al. Pilot study of multiple intravitreal injections of ranibizumab in patients with center-involving clinically significant diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2006;113:1707-1712.
16. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003;289:2560-2572. Erratum in: *JAMA* 2003;290:197.
17. Chylack LT, Wolfe JK, Singer DM, et al. The lens opacities classification system III. *Arch Ophthalmol* 1993;111:831-836.
18. Costa RA, Calucci D, Skaf M, et al. Optical coherence tomography 3: Automatic delineation of the outer neural retinal boundary and its influence on retinal thickness measurements. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2399-2406.
19. Costa RA, Skaf M, Melo LA Jr, et al. Retinal assessment using optical coherence tomography. *Prog Retin Eye Res* 2006;25:325-353. Epub 2006 May 22

20. Massin P, Erginay A, Haouchine B, et al. Retinal thickness measurement in healthy subjects using optical coherence tomography mapping software. *Eur J Ophthalmol* 2002;12:102-108.
21. Massin P, Vicaud E, Haouchine B, et al. Reproducibility of retinal mapping using optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1135-1142.
22. Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin®) for macular oedema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005;36:336-339.
23. Costa RA, Jorge R, Calucci D, Cardillo JA, Melo LA Jr, Scott IU. Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization caused by AMD (IBeNA Study): Results of a phase 1 dose-escalation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4569-4578.
24. Costa RA, Jorge R, Calucci D, Melo LA Jr, Cardillo JA, Scott IU. Intravitreal bevacizumab (avastin) for central and hemicentral retinal vein occlusions: IBeVO study. *Retina* 2007;27:141-149.
25. Kim SJ, Equi R, Bressler NM. Analysis of macular edema after cataract surgery in patients with diabetes using optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2007 May;114(5):881-9. Epub 2007 Feb 1.
26. Hirooka K, Shiraga F, Tanaka S, Baba T, Mandai H. Risk factors for elevated intraocular pressure after trans-tenon retrobulbar injections of triamcinolone. *Jpn J Ophthalmol* 2006;50:235-238
27. Roth DB, Chieh J, Spirn MJ, Green SN, Yarian DL, Caudhry NA. Noninfectious endophthalmitis associated with intravitreal triamcinolone injection. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1279-1282.
28. Jonas JB, Dreissig I, Degenring R. Endophthalmitis after intravitreal injection of triamcinolone acetate. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1663-1664.

29. Agrawal S, Agrawal J, Agrawal TP. Conjunctival ulceration following triamcinolone injection. *Am J Ophthalmol* 2003;136:539-540.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Central macular thickness ( $\mu\text{m}$ ) after intravitreal bevacizumab and triamcinolone treatments by visit (asterisks indicate within-group significant changes from baseline values (\*\* $p < 0.01$ ))

**Figure 2.** Best-corrected visual acuity (LogMAR) after intravitreal bevacizumab and triamcinolone treatments by visit (asterisks indicate within-group significant changes from baseline values ([\* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ])).

**Figure 3.** Intraocular pressure (mmHg) after intravitreal bevacizumab and triamcinolone treatments by visit (asterisks indicate within-group significant changes from baseline values (\*\*  $p < 0.01$ )).



**TABLE 1.** Patient demographic data and baseline characteristics.

Variable	Group	
	IBe	ITA
Age (years)		
Mean	65.58	67.08
± 1 SD	8.44	4.67
Gender (n, %)		
Male	7 (54.0)	8 (61.5)
Female	6 (46.0)	5 (37.5)
Duration of diabetes (years)		
Mean	12.33	12.66
± 1 SD	5.34	5.69
Treatment regimen for diabetes (n, %)		
No insulin	7 (54.0)	7 (54.0)
Insulin	6 (46.0)	6 (46.0)
HbA1c (%)		
Mean	8.65	8.79
± 1 SD	0,85	0,88
Status of diabetic retinopathy (n, %)		
Moderate NPDR	2 (15.0)	3 (23.0)
DR inactivated by PRP	11 (85.0)	10 (77.0)
Duration of macular edema (months)		
Mean	9,38	8,92
± 1 SD	4,59	3,71
Number of grid sessions		
Mean	1,09	1,14
± 1 SD	0,30	0,36

IBe = intravitreal bevacizumab injection; ITA = intravitreal triamcinolone acetonide injection; DR = diabetic retinopathy; HbA1c = glycosylated hemoglobin; IVI = intravitreal injection; NPDR = non-proliferative diabetic retinopathy; PRP = panretinal photocoagulation; SD = standard deviation.

**TABLE 2.** Mean visual acuity, central macular thickness, and intraocular pressure values by study visit.

Study Period	Group IBE			Group ITA		
	VA (logMAR $\pm$ SEM)	CMT ( $\mu$ m $\pm$ SEM)	IOP (mmHg $\pm$ SEM)	VA (logMAR $\pm$ SEM)	CMT ( $\mu$ m $\pm$ SEM)	IOP (mmHg $\pm$ SEM)
Baseline	0.9375 $\pm$ 0.0615	466.00 $\pm$ 38.16	14.00 $\pm$ 0.49	0.9366 $\pm$ 0.0569	440.33 $\pm$ 36.14	14.91 $\pm$ 0.77
1 week	0.8500 $\pm$ 0.0654	404.00 $\pm$ 34.47	13.58 $\pm$ 0.39	0.8216 $\pm$ 0.0504	366.58 $\pm$ 32.57	15.83 $\pm$ 0.95
4 weeks	0.7975 $\pm$ 0.0691	356.08 $\pm$ 30.11	14.33 $\pm$ 0.61	0.7150 $\pm$ 0.0398	272.91 $\pm$ 33.87	17.16 $\pm$ 1.07
8 weeks	0.8333 $\pm$ 0.0759	365.08 $\pm$ 32.45	13.91 $\pm$ 0.45	0.6900 $\pm$ 0.0521	279.33 $\pm$ 34.05	15.33 $\pm$ 0.68
12 weeks	0.8625 $\pm$ 0.0715	435.08 $\pm$ 26.01	14.08 $\pm$ 0.43	0.7425 $\pm$ 0.0497	318.41 $\pm$ 37.26	15.08 $\pm$ 0.60
24 weeks	0.9125 $\pm$ 0.0744	449.86 $\pm$ 19.70	14.33 $\pm$ 0.51	0.9233 $\pm$ 0.0572	398.08 $\pm$ 35.01	15.58 $\pm$ 0.71

CMT = central macular thickness; IBE= intravitreal injection of bevacizumab; IOP = intraocular pressure;  
 ITA = intravitreal injection of triamcinolone acetonide; logMAR = logarithm of minimum angle of  
 resolution; SEM = Standard error of the mean; VA = visual acuity.

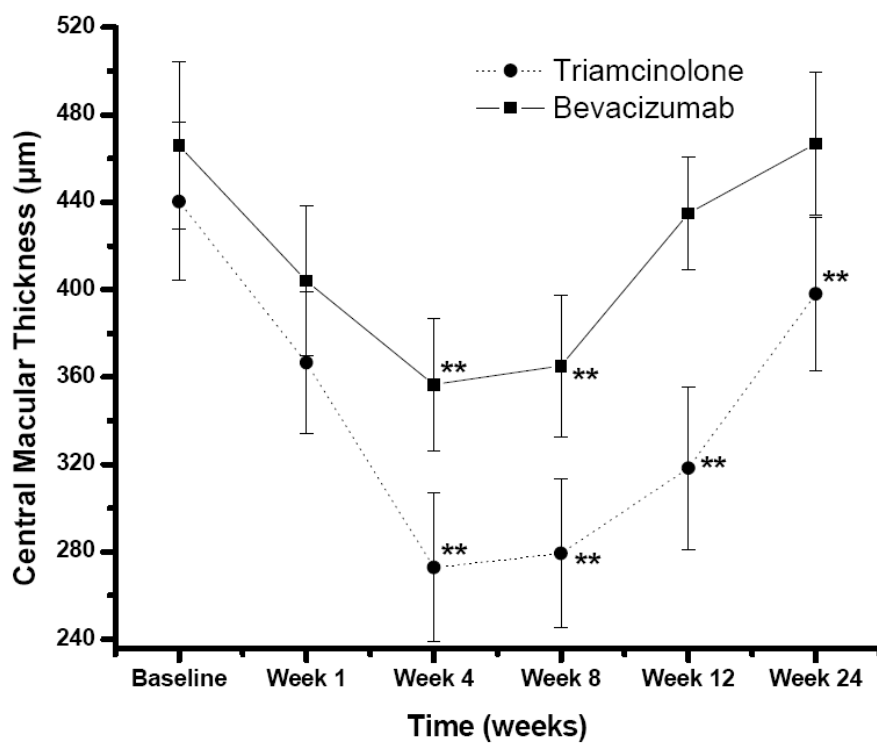


Figure 1

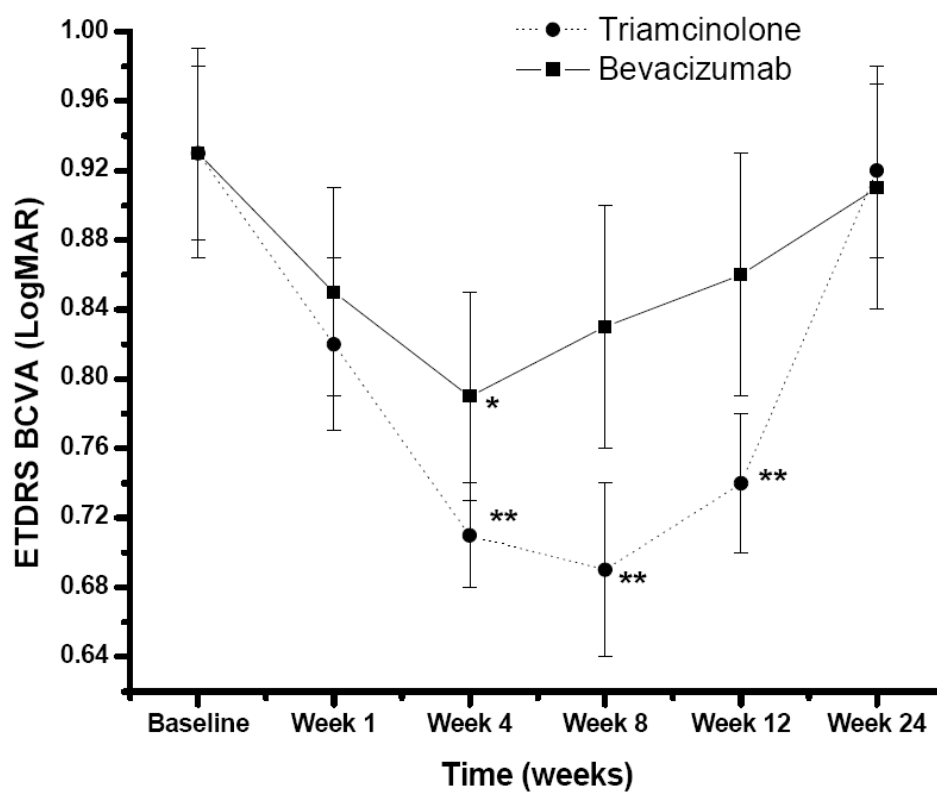


Figure 2

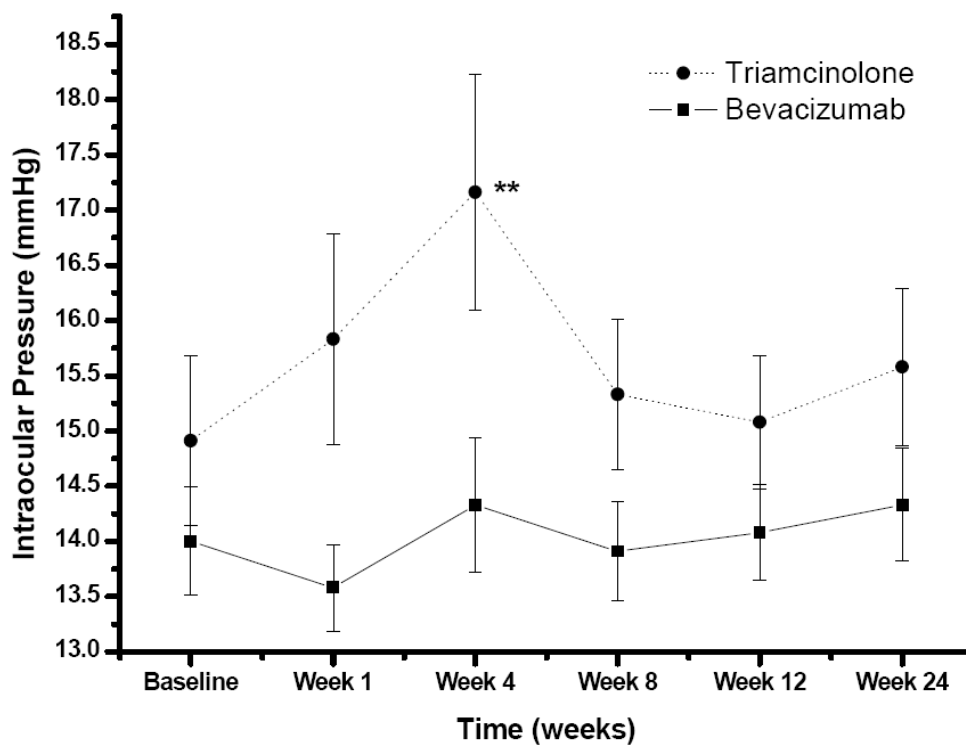


Figure 3

A primeira contribuição deste trabalho, utilizando-se bevacizumabe para edema macular, foi verificar a resposta da espessura macular e da acuidade visual após o tratamento com uma injeção intravítrea de 1,5mg. Como verificado por Cunningham et al., (2005), utilizando pegaptanibe, e também por Haritoglu et al. (2006), utilizando bevacizumabe, o estudo IBEME comprovou que a redução da espessura macular com uma única injeção de agente anti-VEGF aproxima-se de 100 $\mu$ m, e o ganho de acuidade visual varia de uma a duas linhas da tabela de Snellen (5 a 10 letras). Arevalo et al. (2007) retrospectivamente, mostraram resultados melhores: aumento médio próximo de 3 linhas na tabela do ETDRS (aproximadamente 15 letras) e redução da média da espessura macular em torno de 120 $\mu$ m. Como discutido acima, o fato de terem utilizado o Avastin<sup>®</sup> como tratamento primário pode ter eliminado casos crônicos de edema macular, já submetidos a múltiplos tratamentos e, portanto, com pior prognóstico visual (AREVALO et al., 2007).

Outra contribuição importante foi demonstrar que a injeção intravítrea de 4 mg de triancinolona leva a maiores reduções da espessura macular e maiores ganhos em termos de acuidade visual do que a de 1,5mg Avastin<sup>®</sup>, sendo que o efeito da triancinolona se mantém por tempo mais prolongado, levando-se em conta os valores da consulta basal. Portanto, após o estudo IBEME, fica claro que a triancinolona leva a resultados melhores que o bevacizumabe em se tratando de pacientes com edema macular refratário. Vale, entretanto, uma ressalva: como demonstrado por outros autores (BONINI-Filho et al., 2005; MASSIN et al., 2004), a triancinolona apresentou como efeito adverso o aumento transitório da pressão intra-ocular, o que não ocorre com bevacizumabe. Em longo prazo, o tratamento com triancinolona também está

associado com maior incidência e progressão de catarata. Portanto, para pacientes com glaucoma, para pacientes que respondem com aumento de pressão intra-ocular, quando usam corticóide tópico, e para pacientes fácicos que não aceitem o risco de desenvolver catarata, uma opção seria a injeção repetida de antiangiogênico, como reportado retrospectivamente por Arevalo et al. (2007). Especula-se que injeções repetidas possam obter resultados melhores em termos de redução da espessura da retina e melhora visual do que uma única injeção. De fato, Chun, utilizando injeções mensais de ranibizumabe, durante os 3 primeiros meses de tratamento para edema macular diabético, obteve melhora de 15 letras na acuidade visual de 40% dos pacientes, após três meses de tratamento, e redução média na espessura macular de 197,8 $\mu$ m, resultados que se assemelham àqueles obtidos com a triancinolona nesse e em outros estudos (BONINI-Filho et al., 2005; MASSIN et al., 2004).

## 5 DOR ASSOCIADA À INJEÇÃO INTRAVÍTREA DE BEVACIZUMABE

Concomitantemente aos estudos de bevacizumabe e retinopatia diabética já apresentados, optou-se por estudar a dor relativa ao procedimento de injeção intravítrea de bevacizumabe. A idéia deste estudo veio da falta de padronização do processo de anestesia para injeção intravítrea de fármacos. Consultando a literatura, verificou-se diversos tipos de anestesia para tal procedimento (FRIEDMAN & MARGO, 2006; KARDELI & AVCI, 2006; KISHORE et al., 2001), variando desde a anestesia tópica com uma gota de colírio de proximetacaína até a infiltração peribulbar de anestésicos (KISHORE et al., 2001). Na época da elaboração do estudo da dor relativa à injeção intravítrea de bevacizumabe, havia apenas um estudo retrospectivo comparando a anestesia com gel de lidocaína *versus* a anestesia com lidocaína subconjuntival para o alívio da dor relativa à injeção intravítrea de triancinolona. No entanto, em setembro de 2006, Kaderli e Avci publicaram estudo comparativo entre a anestesia tópica (solução de xilocaína) *versus* a anestesia subconjuntival, utilizando o mesmo anestésico para injeção intravítrea de triancinolona. Em novembro de 2006, a publicação dos resultados de um ensaio clínico randomizado mostrava que o gel de xilocaína era similar à infiltração subconjuntival do mesmo anestésico para se aliviar a dor relativa à injeção intravítrea de corticóide (FRIEDMAN & MARGO, 2006). Nenhum desses estudos incluía, no entanto, a técnica de anestesia tópica com colírio de proximetacaína, e a anestesia peribulbar, também utilizadas por alguns centros (KISHORE et al., 2001; MASSIN et al., 2004), incluindo o Setor de Retina e Vítreo do HCFMRP-USP. Era preciso, portanto, estudo comparativo para revelar qual seria a



forma menos dolorosa e, portanto, mais confortável para se administrar o Avastin® aos pacientes. Além da falta de padronização da técnica anestésica, após a explosão do uso de antiangiogênicos intravítreos, a partir do final de 2005, dentre eles bevacizumabe, pegaptanibe e ranibizumabe, a injeção intravítrea passou a ser procedimento oftalmológico realizado com frequência, pois alguns protocolos postulam a injeção de fármacos a cada seis semanas, por um período de nove meses (GRAGOUDAS et al., 2004). Portanto, era indubitável a necessidade de se tornar a injeção intravítrea de Avastin menos desconfortável possível. Planejou-se então mensurar a dor relacionada à injeção intravítrea de bevacizumabe em pacientes submetidos a três técnicas diferentes de anestesia, anteriormente mencionadas: colírio de proximetacaína (tópica), infiltração subconjuntival de xilocaína (subconjuntival) e bloqueio peribulbar com xilocaína (peribulbar). Além da dor, também se mensurou importante complicação dos procedimentos oculares, relacionadas à técnica anestésica, que é a hemorragia subconjuntival (FRIEDMAN & MARGO, 2006), motivo de apreensão e pavor por muitos dos pacientes após procedimentos oftalmológicos. O trabalho foi então realizado, como a seguir, e enviado ao *American Journal of Ophthalmology*.

**5.1 COMPARATIVE STUDY OF  
ANALGESIC EFFECTIVENESS USING THREE DIFFERENT ANESTHETIC  
TECHNIQUES FOR INTRAVITREAL INJECTION OF BEVACIZUMAB**

Editorial Manager(tm) for American Journal of Ophthalmology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: COMPARATIVE STUDY OF ANALGESIC EFFECTIVENESS USING THREE DIFFERENT ANESTHETIC TECHNIQUES FOR BEVACIZUMAB INTRAVITREAL INJECTION

Short Title: Anesthesia for Intravitreal Bevacizumab

Article Type: Original Article

Keywords: anesthesia; bevacizumab; injection; pain; proxymetacaine; xylocaine

Corresponding Author: Rodrigo Jorge, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo

First Author: Léssia P Cintra, MD

Order of Authors: Léssia P Cintra, MD; Levy R Lucena, MD; José A da Silva, PhD; Rogério A Costa, MD, PhD; Ingrid U Scott, MD, MPH; Rodrigo Jorge, MD, PhD

## ABSTRACT

**Purpose:** To compare the analgesic effectiveness and aesthetic appearance associated with topical, subconjunctival and peribulbar anesthesia for intravitreal bevacizumab injection.

**Design:** Prospective, comparative study.

**Methods:** Setting: Tertiary ophthalmic referral center. Study Population: Sixty patients who were randomized (1:1:1) to receive one of three forms of anesthesia (topical, subconjunctival, and peribulbar) for their first intravitreal bevacizumab injection.

Observation procedures: Extension (in clock-hours) of subconjunctival hemorrhage (SCH) as well as injection-related pain (IRP) and entire procedure pain (EPP, including anesthesia administration) using one Visual Analog Scale which ranges from 0 (no pain at all) to 100 (the most intense pain one could ever feel). Main Outcome Measures: IRP, EPP, and SCH.

**Results:** Median (range) IRP scores for the topical, subconjunctival, and peribulbar groups were 5 (0–22), 3 (0–25), and 0 (0–11), respectively ( $P=0.002$ ). Median IRP score was significantly lower in the peribulbar group ( $P<0.05$ ). Median (range) EPP scores for the topical, subconjunctival, and peribulbar groups were 5 (0–25), 4.45 (0–27), and 9.5 (2–30), respectively ( $P=0.012$ ). Median EPP score was significantly higher in the peribulbar group ( $P<0.05$ ). The median (range) number of clock-hours of SCH in the topical, subconjunctival, and peribulbar groups was 1 (0–2), 4 (2–12), and 1 (3–7), respectively ( $P<0.0001$ ). The median extent of SCH was significantly lower in the topical group ( $P<0.05$ ).

**Conclusions:** Among the three anesthetic techniques, peribulbar anesthesia was associated with greater effectiveness in controlling IRP but was least effective in controlling EPP. There was no significant difference in pain scores between the topical and subconjunctival groups, and topical anesthesia was associated with less SCH.

Thomas J. Liesegang, M.D., Editor-in-Chief  
American Journal of Ophthalmology  
Mayo Clinic  
4500 San Pablo Road  
Jacksonville, FL 32224-1865

June 4th, 2007

Dear Dr. Liesegang,

Enclosed please find our manuscript, entitled “**Comparative Study of Analgesic Effectiveness Using Three Different Anesthetic Techniques for Bevacizumab Intravitreal Injection**”, for your consideration for publication in the American Journal of Ophthalmology. To our knowledge, and based on a search of the Medline database, this is the first report of a comparative study regarding analgesic effectiveness between topical, subconjunctival and peribulbar anesthetic techniques for intravitreal injections.

This study has already been submitted to Ophthalmology Journal and rejected. Dr. Andrew Schachat (editor –in-chief) complaint was mainly based on safety issues, such as “inadvertent globe penetration”. As he also mentioned, we would need around 1.500 injections to address this issue. We agree with him, but since the very beginning and also after his review, we emphasize analgesic effectiveness. We still believe this is the critical issue regarding intravitreal injections and we did make a correct scientific approach on this topic. Dr. Schachat ends his review stating: “I think your paper is better suited to a more specialized journal and I am sure it will be accepted at a good one”. Our thought is that the information provided by our study is of great interest for ophthalmologists, rather than pain specialists or anesthesiologists. For this reason, we are submitting this paper to a different prominent journal.

Thank you for considering our work.

Sincerely,

Rodrigo Jorge, MD, PhD  
Professor of Ophthalmology

**COMPARATIVE STUDY OF ANALGESIC EFFECTIVENESS USING  
THREE DIFFERENT ANESTHETIC TECHNIQUES FOR BEVACIZUMAB  
INTRAVITREAL INJECTION**

Léssia P. Cintra, MD,<sup>1</sup> Levy R. Lucena, MD,<sup>1</sup> José A. da Silva, PhD,<sup>2</sup>

Rogério A. Costa, MD, PhD,<sup>1,3</sup> Ingrid U. Scott, MD, MPH,<sup>4</sup> Rodrigo Jorge, MD, PhD<sup>1</sup>

From the <sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; <sup>2</sup>Department of Psychology, Faculty of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo; <sup>3</sup>U.D.A.T. – Macular Imaging & Treatment Division, Hospital de Olhos de Araraquara, Araraquara, SP, Brazil; and <sup>4</sup>Departments of Ophthalmology and Health Evaluation Sciences, Penn State College of Medicine, Hershey, PA, USA.

**Corresponding author:**

Professor Dr. Rodrigo Jorge

Departamento de Oftalmologia, Hospital das Clínicas

Avenida Bandeirantes 3900. Ribeirão Preto, SP 14049-900 BRAZIL

Telephone/fax: 55(16) 3602-2523/3602-2860

E-mail: [rjorge@fmrp.usp.br](mailto:rjorge@fmrp.usp.br)

Short title: Anesthesia for Intravitreal Bevacizumab

Source of Funding for the study: Investigators' driven study

Conflict of Interest: None

Intravitreal injection represents a direct route of drug delivery into the posterior segment of the eye. This technique has the ability to provide immediate high vitreous levels of drugs, such as antibiotics, antivirals,<sup>1</sup> antifungals,<sup>2</sup> steroids,<sup>3</sup> and, more recently, anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) agents.<sup>4-7</sup> Bevacizumab is a humanized, full-length monoclonal antibody against all isoforms of the VEGF-A family and has demonstrated promising preliminary results when used intravitreally for the management of choroidal and retinal diseases associated with neovascular formations.<sup>8-12</sup>

The type of anesthesia employed for intravitreal injections varies according to surgeon experience and preference. Types of anesthesia which have been employed for intravitreal injection include topical eyedrops or gel,<sup>13,14</sup> peribulbar and subconjunctival injections,<sup>15,16</sup> and placement of an anesthetic-soaked cotton-tipped applicator over the injection site for a short period of time before the injection.<sup>16</sup> Given that multiple intravitreal injections are needed to maintain a desirable effect associated with intravitreal anti-angiogenic treatment for such conditions as age-related macular degeneration (AMD),<sup>4,5</sup> the importance of patient comfort and the variety of anesthetic methods available led us to design a study to compare the analgesic effectiveness of three types of anesthesia used for intravitreal injection.

## **METHODS**

The study protocol adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the local Institutional Review Board, and all participants gave written informed consent to participate in the study. All patients evaluated at the Retina Section of the Department of Ophthalmology, School of Medicine of Ribeirão Preto who were scheduled to receive their first intravitreal bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>; Genentech, Inc.; South San Francisco, CA) injection between December 2005 and July 2006 were invited to participate in the study.

The diseases for which patients were being treated with intravitreal bevacizumab include: neovascular AMD, proliferative diabetic retinopathy, and diabetic macular edema. None of the

patients had received subconjunctival, peribulbar or intravitreal injections previously. Patients were excluded if they had: 1) a history of pars plana vitrectomy, 2) any major surgery within the prior 28 days or planned within the next 6 months, 3) any history of a thromboembolic event, 4) uncontrolled systemic arterial hypertension (diastolic pressure  $\geq 90$  mmHg, or systolic pressure  $\geq 140$  mmHg), 5) bleeding disorders or peptic ulcer disease with bleeding, and 6) known coagulation abnormalities or current use of anticoagulative medication other than aspirin.

### **Treatment Assignment**

Patients were randomly assigned to one of the three types of anesthesia (topical, subconjunctival, or peribulbar) prior to admission at the procedure room. For all patients, one drop of 0.5% proxymetacaine chlorhydrate (Anestalcon<sup>®</sup>; Alcon Inc., Fortworth, Texas) and one drop of 5% topical povidone-iodine were administered before placement of the eyelid speculum. After that, the assigned anesthesia (topical, subconjunctival, or peribulbar) was administered as follows. In the Topical group, patients received one additional drop of 0.5% proxymetacaine chlorhydrate and gentle pressure with a cotton-tipped applicator soaked in 5 drops of proxymetacaine chlorhydrate was applied over the injection site for 30 seconds. In the Subconjunctival group, patients received 0.4ml of 2% xylocaine (Xylestesin<sup>®</sup>; Cristália, São Paulo, Brazil) injected via a 30½-gauge inch disposable needle (Becton Dickinson Ltda., Curitiba, Brazil) into the subconjunctival space 3.5mm posterior to the inferotemporal limbus and the anti-VEGF injection was performed 60 seconds later. In the Peribulbar group, a transpalpebral orbital inferotemporal injection was performed, inserting a 27¾-gauge inch disposable needle (Hurricane Medical, Bradenton, Florida) to inject extraconally 4ml of 2% xylocaine when the tip of the needle was judged to be located beyond the equator of the globe. (**Table 1**). Intravitreal injection was performed 10 minutes after anesthesia.

The intravitreal injection procedure was the same for all 60 patients, as follows. The injection site was determined by positioning the caliper 3.0mm (pseudophakic) or 3.5mm



(phakic) posterior to the inferotemporal limbus. All patients were informed when the intravitreal injection had just been performed. All injections were performed by the same retina specialist (RJ) using a 29½-gauge needle and 0.06ml of bevacizumab. Two drops of moxifloxacin 0.5% (Vigamox; Alcon Inc., Fortworth, Texas) were applied topically post-injection. No sedative was given to any patient.

### **Main Outcome Measures**

#### Injection-related pain (IRP) and entire procedure pain (EPP) scores

Pain scores were evaluated by a single masked retina specialist (LPC) 15 minutes after completion of the intravitreal injection. For pain score estimation, a 100-degree Visual Analog Scale (VAS) was employed (**Figure 1**). The numbers of the scale were visible only on the examiner's side, so that patients could not choose the same number to guide pain scores.<sup>15</sup> Prior to rating level of pain, each patient was asked to slide the marker along the entire scale, with the aid of the examiner. At point 0, the examiner clarified to the patient that this point of the scale represented "no pain at all"; at point 100, the examiner clarified to the patient that this point of the scale represented "the most intense pain one could ever feel". Initially, the patient was asked about the amount of pain he felt at the moment of the injection procedure (injection-related pain, IRP). Subsequently, the patient was asked about the intensity of pain during the whole procedure (entire procedure pain, EPP). A second test to score IRP and EPP was performed in 5 minutes, and the average score of the 2 tests was recorded.

#### Subconjunctival hemorrhage evaluation

Pictures of the anterior segment of the eye were taken 24 hours after the intravitreal injection procedure using a digital retinal fundus camera (AngioCam<sup>®</sup> Digital Angiographic System; Opto, São Carlos, Brazil). The area of subconjunctival hemorrhage was measured circumferentially and noted as number of clock hours.

### Statistical Analysis

Nonparametric one-way analysis of variance was used to compare the difference in pain scores and area of subconjunctival hemorrhage among the three study groups (Kruskal-Wallis test). Dunn's post test was used for multiple comparisons. The level of significance was set at  $P<0.05$ .

### RESULTS

Demographic data for the patients in the three groups are summarized in **Table 2**. There were no significant differences between the three treatment groups regarding age, gender, or laterality of eye receiving the intravitreal injection. There was a comparable distribution of underlying disease in both groups (neovascular AMD, proliferative diabetic retinopathy, and diabetic macular edema).

There was a significant difference in median IRP scores among the three groups ( $P=0.002$ , Kruskal-Wallis test) (**Figure 2**). The median IRP score in the Peribulbar group was 0 (zero; range, 0 – 11) and was significantly lower than median IRP scores in the Topical (5; range, 0 – 22) and Subconjunctival (3; range, 0 – 25) groups ( $P<0.05$ , Dunn's post test). There was no significant difference in median IRP scores between the Topical and Subconjunctival groups ( $P>0.05$ , Dunn's post test).

There was a significant difference in median EPP scores among the three groups ( $P=0.01$ , Kruskal-Wallis test) (**Figure 3**). The median EPP score for the Peribulbar group was 9.5 (range, 2 – 30), which was significantly higher than the median EPP scores for the Topical (5; range, 0 – 25) and Subconjunctival (4.45; range, 0 – 27) groups ( $P<0.05$ , Dunn's post test). There was no significant difference in median IRP scores between the Topical and Subconjunctival groups ( $P>0.05$ , Dunn's post test).

There was a significant difference in the median number of clock hours of subconjunctival hemorrhage (SCH) among the three groups ( $P < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test) (**Figure 4**). The median area of SCH for the Topical group was 1 clock hour (range, 0 – 2), which was significantly lower than the median SCH area for the Subconjunctival (4; range, 2 – 12) and Peribulbar (3; range, 1 – 7) groups ( $P < 0.05$ , Dunn's post test). There was no significant difference in median area of SCH between the Subconjunctival and Peribulbar groups ( $P > 0.05$ , Dunn's post test).

## DISCUSSION

In the current era of pharmacomodulation of various posterior segment diseases using such drugs as antiangiogenic agents and steroids, intravitreal injection has become a frequently performed vitreoretinal procedure. Nevertheless, there are only few reports of the analgesic effects of the different types of anesthesia employed for this procedure.<sup>13,14,16</sup> The topical, subconjunctival and peribulbar routes are the main routes of anesthetic administration for eye procedures, including intravitreal injections.<sup>13-16</sup> In the current study, we employed eye drops instead of gel for topical anesthesia, since the former have been used more frequently in the available peer-reviewed literature. In addition, the cost associated with the procedure using eye drops is 3.5 times lower than the cost when 2% lidocaine gel is employed.

The numerical VAS used in the current study is a derivative of the standard VAS reported in the past.<sup>17-19</sup> It is linear, but the data obtained are not necessarily always normally distributed. For this reason, we used nonparametric statistical tests to analyze our data. In addition, most patients may not use all of the scale, and repeated scoring with a VAS can carry a variance as high as 20%.<sup>20</sup> To minimize this effect, the examiner first demonstrated and explained the entire range of the scaled ruler. In addition, scores used in the present study were averaged from two separate scores for each question, thus reducing pain scoring bias.

As expected, IRP was significantly lower in the Peribulbar group, since the pain stimulus associated with the intravitreal injection was probably almost entirely blocked by the effect of lidocaine (administered via peribulbar injection) on the ophthalmic nerve fibers. Subconjunctival and topical anesthesia are believed to induce quite similar anesthetic effects, both acting directly on pain receptors located in the conjunctiva and uvea. In the current study, both procedures were equivalent regarding their analgesic effects. On the other hand, Kaderli and Avci<sup>16</sup> recently reported that IRP was significantly lower with subconjunctival anesthesia when compared with topical anesthesia in patients undergoing intravitreal injections. This disparity may be related, at least in part, to differences in the topical anesthesia technique used. While one drop of proxymetacaine and gentle pressure with an anesthetic-soaked cotton-tipped applicator for 30 seconds was used in the current study, Kaderli and Avci<sup>16</sup> used 4% saline-diluted lidocaine and slight pressure for 5 minutes. Dilution of the local anesthetic may influence sodium and chloride ion concentrations of the drug and, consequently, the analgesic effect.<sup>21</sup> In addition, Kaderli and Avci employed a 4-point pain scale, which can more easily lead to bias than a 100-degree scale as reported by Da Silva and Ribeiro-Filho.<sup>22</sup> Despite these differences, Kaderli and Avci<sup>16</sup> also found that the pain associated with the entire procedure is similar in the topical and subconjunctival groups, as confirmed in the current study.

Pain related to the entire procedure was significantly higher in the Peribulbar group. Pain associated with peribulbar anesthesia relies on stimulation of nociceptors on the skin and orbit during peribulbar needle penetration and anesthetic injection. However, some physicians<sup>12</sup> use this type of anesthesia because the risk of eye movement during intravitreal injection is diminished due to the practical absence of pain and the motor block associated with a 4ml lidocaine peribulbar injection.

The area of subconjunctival hemorrhage was significantly lower in the Topical group, consistent with the results of another study.<sup>16</sup> Subconjunctival hemorrhage is a cosmetically undesired complication of intravitreal injection, especially when such injections are repeated on

a monthly<sup>4</sup> or bimonthly basis.<sup>8</sup> In addition, subconjunctival hemorrhage can be associated with ocular irritation and dryness.

In summary, although peribulbar block was the most effective of the three anesthetic techniques tested in the current study to reduce pain at the time of intravitreal injection administration, it was associated with the most pain when considering all steps involved in the procedure (that is, administration of anesthesia plus administration of the intravitreal injection). Topical and subconjunctival anesthesia were associated with lower EPP scores. Considering overall pain scores, coupled with aesthetic appearance outcome and the potential ocular irritation and dryness associated with subconjunctival hemorrhage which can persist for days or weeks, topical anesthesia may be considered the anesthetic technique of choice for most patients undergoing intravitreal injections of bevacizumab.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This was an investigators' driven study sponsored by RAC and RJ. JAS and RJ have participated in the conception and design of the study; data collection was performed by LPC, and LRL and interpreted by JAS, RAC and IUS. Three authors (LPC, RAC and RJ) have drafted the original article whereas others three (LRL, JAS, IUS) revised it critically for important intellectual content. All six authors had the opportunity to comment on the final draft prior to submission. Manuscript submission was performed after unanimous decision.

## REFERENCES

1. Taskintuna I, Rahhal FM, Arevalo JF, et al. Low-dose intravitreal cidofovir (HPMPC) therapy of cytomegalovirus retinitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmology* 1997;104:1049-57.
2. Scott IU, Cruz-Villegas V, Flynn HW Jr, Miller D. Delayed-onset, bleb-associated endophthalmitis caused by *Lecythophora mutabilis*. *Am J Ophthalmol* 2004;137:583-5.
3. Bonini-Filho MA, Jorge R, Barbosa JC, Calucci D, Cardillo JA, Costa RA. Intravitreal injection versus sub-Tenon's infusion of triamcinolone acetonide for refractory diabetic macular edema: a randomized clinical trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3845-9.
4. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, et al. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004;351:2805-16.
5. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355:1419-31.
6. Luke M, Warga M, Ziemssen F, Gelisken F, Grisanti S, Schneider T, et al. Effects of bevacizumab on retinal function in isolated vertebrate retina. *Br J Ophthalmol* 2006;90:1178-82.
7. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005;36:133-5.
8. Costa RA, Jorge R, Calucci D, Cardillo JA, Melo LA, Scott IU. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for choroidal neovascularization caused by AMD (IBeNA Study): results of a phase I dose-escalation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4569-78.
9. Avery RL. Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* 2006;26:352-4.

10. Silva Paula J, Jorge R, Costa RA, Rodrigues ML, Scott IU. Short-term results of intravitreal bevacizumab (Avastin) on anterior segment neovascularization in neovascular glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84:556-7.
11. Jorge R, Costa RA, Calucci D, Cintra LP, Scott IU. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBePe Study). *Retina* 2006;26:1006-13.
12. Spaide RF, Fisher YL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 2006;26:275-8.
13. Friedman SM, Margo CE. Topical gel vs subconjunctival lidocaine for intravitreal injection: a randomized clinical trial. *Am J Ophthalmol* 2006;142:887-8.
14. Kozak I, Cheng L, Freeman WR. Lidocaine gel anesthesia for intravitreal drug administration. *Retina* 2005;25:994-8.
15. Kishore K, Conway MD, Peyman GA. Intravitreal clindamycin and dexamethasone for toxoplasmic retinochoroiditis. *Ophthalmic Surg Lasers* 2001;32:183-92.
16. Kaderli B, Avci R. Comparison of topical and subconjunctival anesthesia in intravitreal injection administrations. *Eur J Ophthalmol* 2006;16:718-21.
17. Huskisson EC. Visual analogue scales. In: Melzak R, editor. *Pain measurement and assessment*. New York: Raven Press, 1983:33-7.
18. Price DD, McGrath PA, Rafii A, Buckingham B. The validation of visual analogue scales as ratio scale measures for chronic and experimental pain. *Pain* 1983;17:45-56.
19. Price DD, Bush FM, Long S, Harkins SW. A comparison of pain measurement characteristics of mechanical visual analogue and simple numerical rating scales. *Pain* 1994;56:217-26.
20. Rosier EM, Iadarola MJ, Coghill RC. Reproducibility of pain measurement and pain perception. *Pain* 2002;98:205-16.



21. Kanai A, Hoka S. A comparison of epidural blockade produced by plain 1% lidocaine and 1% lidocaine prepared by dilution of 2% lidocaine with the same volume of saline. *Anesth Analg* 2006;102:1851-5.
22. Da Silva JA, Ribeiro-Filho NP. Avaliação e mensuração de dor: pesquisa, teoria e prática. Ribeirão Preto, S.P: Funpec, 2006:279-325, 327-348, 349-390, 391-432.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Patient scoring his pain after intravitreal injection of bevacizumab. Note that the scale has the numbers on the examiner's side.

**Figure 2.** Injection-related pain (IRP) scores for bevacizumab intravitreal injections according to the type of anesthesia. The Topical group had the highest median score (straight line). IPP scores and medians are similar ( $P>0.05$ ) for the Topical and Subconjunctival groups. Note that the majority of patients in the Peribulbar group had no injection-related pain.

**Figure 3.** Entire procedure pain (EPP) scores for bevacizumab intravitreal injections according to the type of anesthesia. The Peribulbar group had the highest median score (straight line). EPP scores and medians are similar ( $P>0.05$ ) for the Topical and Subconjunctival groups.

**Figure 4.** Number of clock hours of subconjunctival hemorrhage measured 24 hours after bevacizumab intravitreal injection according to the type of anesthesia. Note that the median (straight line) area of subconjunctival hemorrhage was lowest in the Topical group and highest in the Subconjunctival group.

**Table 1.** Topical, subconjunctival and peribulbar anesthetic techniques.

	Anesthetic	Volume	Technique
<b>Topical</b>	0,5% proxymetacaine chlorhydrate	6 drops of proxymetacaine chlorhydrate	one drop of 0.5% proxymetacaine chlorhydrate administered over injection site followed by 30 seconds of gentle pressure with a cotton-tipped applicator soaked in 5 drops of proxymetacaine chlorhydrate
<b>Subconjunctival</b>	2% xylocaine	0,4mL of 2% xylocaine	subconjunctival injection of 0.4mL of 2% xylocaine
<b>Peribulbar</b>	2% xylocaine	4mL of 2% xylocaine	transpalpebral inferotemporal injection of 4mL of 2% xylocaine extraconally

**Table 2.** Patient demographic data

	Age* (Years)	Gender	Study Eye	Disease
<b>Topical</b>	59.80 ± 11.52	9♀, 11♂	7 RE, 13 LE	11 PDR, 4 AMD, 5 CSME
<b>Subconjunctival</b>	60.86 ± 10.13	12♀, 08♂	11 RE, 9 LE	9 PDR, 5 AMD, 6 CSME
<b>Peribulbar</b>	57.26 ± 10.93	13♀, 07♂	12 RE, 8 LE	13 PDR, 4 AMD, 3 CSME

\*Mean ± 1SD

AMD = age-related macular degeneration; CSME = clinically significant macular edema;  
LE = left eye; PDR = proliferative diabetic retinopathy; RE = right eye.

Figure 1











A primeira contribuição deste estudo foi mensurar a dor relacionada à injeção intravítrea de Avastin®. Sabe-se agora que a dor relacionada à injeção intravítrea situa-se nos primeiros 30% da escala analógica visual, independentemente do tipo de anestesia utilizada. Indo além, a mediana da dor, relacionada a todo procedimento de injeção intravítrea, foi 4,45 utilizando-se anestesia subconjuntival, 5 com anestesia tópica e 9,5 com bloqueio peribulbar. Em resumo, são escores pequenos de uma escala analógica visual que varia de 0-100 (Da SILVA, 2006), o que prova que a injeção intravítrea é procedimento pouco doloroso.

Mesmo sendo procedimento pouco doloroso, sabe-se que o ideal para o paciente é a menor dor possível, principalmente por se tratar de procedimento que precisa ser repetido várias vezes ao ano (COSTA et al., 2006; GRAGOUDAS et al., 2004). Olhando-se por esse prisma é que se verifica a principal contribuição do presente estudo: verificou-se a técnica mais confortável e menos dolorosa para o paciente receber o bevacizumabe intravítreo.

Das três técnicas estudadas, notou-se que a anestesia tópica com colírio de proximetacaína e a anestesia subconjuntival com xilocaína a 2% foram aquelas que obtiveram melhor avaliação em relação à dor sentida durante todo o procedimento (*Entire Procedure Pain*, EPP), sendo que a anestesia peribulbar com 4ml de xilocaína foi significativamente mais dolorosa. Pelo fato da anestesia tópica causar hemorragia subconjuntival menos extensa, opta-se por indicá-la como a anestesia mais interessante ao paciente tratado com bevacizumabe intravítreo.

## **6 ANTIANGIOGÊNESE E RETINOPATIA DIABÉTICA: NOVAS PERSPECTIVAS**

Desde os primeiros estudos sobre angiogênese com tumores, realizados por Judah Folkman (1971), passando-se pelos estudos experimentais de Aiello et al. (1995), espera-se por essa nova era na qual se pode bloquear o VEGF e, com isso, tratar a retinopatia diabética e outras desordens vasoproliferativas. Está-se, sem dúvida, diante de uma revolução no tratamento dessa afecção retiniana. Os agentes anti-VEGF, como comentado ao longo deste trabalho, podem atuar tanto nas complicações vasoproliferativas da doença, como nas complicações exsudativas. Em outras palavras, podem atuar na formação de neovasos de retina e com isso coibir a ocorrência de complicações como hemorragia vítrea e descolamento de retina tracional. Também pode ser útil para aumentar a adesividade entre as células endoteliais e tratar o edema macular, que representa a principal causa de baixa de visão nos pacientes diabéticos com retinopatia. Em resumo, se os agentes anti-VEGF podem reduzir a ocorrência de descolamento tracional de retina e contribuir para o tratamento do edema macular em diabéticos, com certeza podem ajudar no combate à cegueira, objetivo principal dos profissionais que lidam com saúde ocular.

### **6.1 Edema macular diabético**

Após essa primeira série de trabalhos, nota-se que todos os agentes anti-VEGF possuem efeito significativamente positivo sobre a acuidade visual e espessura macular em casos de edema macular diabético (CHUN et al., 2006; CUNNINGHAM et al., 2005; HARITOGLOU et al., 2006; NGUYEN et al., 2006). No caso do pegaptanibe,

a dose já foi estudada e provou-se que 0,3mg parece ser a mais efetiva para reduzir a espessura macular e melhorar a acuidade visual (CUNNINGHAM et al., 2005). No caso do ranibizumabe e bevacizumabe, serão necessários estudos prospectivos e randomizados para se chegar à dose ideal. As doses reportadas nos estudos variam de 0,3 a 0,5mg para o ranibizumabe (CHUN et al., 2006) e de 1,25 a 2,5mg para o bevacizumabe (AREVALO et al., 2007; HARITOGLOU et al., 2006). Após verificar-se a dose ideal, e após testá-la em pacientes com pior prognóstico (edema macular diabético refratário), deve-se comparar o novo tratamento com o tratamento consagrado: fotocoagulação a *LASER versus* bevacizumabe ou ranibizumabe nas doses ideais em pacientes com edema macular diabético clinicamente significativo, sem tratamento prévio. Tendo sido verificado o poder de cada agente anti-VEGF, da fotocoagulação com *LASER* focal e da injeção intravítrea de triancinolona, será necessário testar as diversas associações entre as três opções terapêuticas, já que possuem princípios de ação diferentes e podem ter efeito sinérgico. Considerando-se apenas o fator ordem de tratamento, há a possibilidade de 6 associações diferentes, se se considerar apenas um dos agentes anti-VEGF (pegaptanibe ou bevacizumabe, ou ranibizumabe). Portanto, há, para o futuro, enorme oportunidade de pesquisa no campo do tratamento do edema macular, com o advento dos novos fármacos antiangiogênicos. Especula-se se o tratamento a *LASER* continuará a ser empregado, frente ao poderio da farmacoterapia. Corticóides e antiangiogênicos deverão preponderar e talvez o *LASER* seja apenas utilizado para casos de edema macular diabético circinado, onde a origem da exsudação é bem determinada, e, geralmente,

advém de microaneurismas localizados no centro de um anel de exsudatos duros e edema.

## **6.2 Retinopatia diabética proliferativa**

Apesar do edema macular diabético ser a principal causa de baixa de visão no paciente diabético (KLEIN et al., 1984a,b), as complicações resultantes da neovascularização de retina são aquelas que potencialmente levam o paciente à perda completa da visão. As complicações mais temidas são as hemorragias vítreas recorrentes e o descolamento tracional de retina, sendo que ambos normalmente são tratados por terapêutica invasiva: vitrectomia *via pars plana*. Com o advento das drogas antiangiogênicas, a terapêutica das complicações vasoproliferativas da retinopatia diabética está mudando. As drogas antiangiogênicas poderão ser empregadas de diferentes formas nos vários estágios da retinopatia diabética para se evitar a cegueira pelo descolamento tracional de retina.

### 1) Casos de retinopatia diabética proliferativa, sem hemorragia vítrea

Para esses pacientes, os agentes anti-VEGF seriam usados para tratar a neovascularização de retina, antes que haja sangramento vítreo e descolamento tracional da mesma. Seria tratamento preventivo: prevenção da cegueira pelo descolamento tracional. Nessa situação, como está sendo investigado por nosso grupo, por meio do estudo IBEHi, precisa-se estudar qual a melhor forma de associação da fotocoagulação a *LASER* com o agente antiangiogênico e qual seria o agente antiangiogênico mais eficaz para se reduzir a neovascularização de retina, causando menores efeitos colaterais. É importante ressaltar que, em casos de neovascularização

de retina muito extensa, ou associada à tração vítreo-retiniana, a utilização de bevacizumabe pode levar ao descolamento de retina tracional em 1 semana. Portanto, no futuro, sempre que se utilizar drogas anti-VEGF, é preciso investigar-se, por meio de biomicroscopia detalhada, ou ultra-som, a situação da interface vítreo-retiniana. Havendo tração do vítreo sobre a retina, é imperativo informar o paciente sobre o risco de descolamento tracional de retina após uso de agente anti-VEGF, como também é de bom senso o seguimento cuidadoso após o procedimento.

## 2) Retinopatia diabética proliferativa associada à hemorragia vítrea

Spaide & Fisher (2006) já relataram o uso com sucesso de bevacizumabe intravítreo para tratamento de hemorragia vítrea em casos de retinopatia diabética proliferativa. Caminha-se, portanto, para o uso de antiangiogênicos intravítreos como primeira opção em casos de retinopatia diabética proliferativa com hemorragia vítrea. Em outras palavras, antes de se tentar a vitrectomia via *pars plana*, realiza-se uma injeção intravítrea de bevacizumabe e acompanha-se o paciente com ultra-som para se avaliar a reabsorção da hemorragia e para a vigilância quanto ao desenvolvimento de descolamento de retina tracional. Enfim, a refinada farmacoterapia atua na causa do sangramento e permite que os mecanismos naturais de reparo do próprio organismo remova o sangramento, em contrapartida ao antigo tratamento físico, indubitavelmente mais invasivo e baseado na retirada mecânica do sangramento (vitrectomia via *pars plana*). Após a reabsorção do sangramento pelo organismo, no caso de tratamento com droga anti-VEGF, a destruição da retina em isquemia, fonte produtora do fator angiogênico, ainda deverá ser realizada por meio de fotocoagulação a *LASER*.

## 3) Uso pré-operatório em pacientes com descolamento de retina tracional

Chen & Park (2006) relataram redução do sangramento e conseqüente melhoria nas condições intra-operatórias de casos de descolamento de retina tracional tratados previamente com injeção intravítrea de bevacizumabe. A regressão dos neovasos pré-operatoriamente diminui o sangramento e melhora a visibilização da interface vítreo-retiniana, facilitando a remoção de pontes fibrovasculares entre a retina e o vítreo. Os antiangiogênicos podem, portanto, também ser empregados para casos avançados de retinopatia diabética, auxiliando na cirurgia do descolamento tracional da retina;.

#### 4) Uso transoperatório em cirurgias de vitrectomia via *pars plana*

Especula-se que para os pacientes com hemorragia vítrea, ou descolamento de retina tracional, com neovasos de retina ativos, que não tenham sido tratados com anti-VEGF intravítreo antes da cirurgia, possa-se utilizar esse agente durante a vitrectomia via *pars plana*, no final da mesma, após o fechamento das esclerotomias. O racional para essa proposta seria induzir a regressão dos neovasos de retina rapidamente após a vitrectomia. Sabe-se que fotocoagulação a *LASER* não regride de imediato a neovascularização de retina, como os antiangiogênicos (estudo IBEHi). Permanecendo ativos após as primeiras semanas de cirurgia, os neovasos de retina podem levar a novo sangramento vítreo no pós-operatório, retardando a recuperação visual (COOPER et al., 2004). Por outro lado, o uso do anti-VEGF intravítreo induziria a uma regressão dos neovasos de retina em dias (AVERY, 2006; SILVA PAULA et al., 2006), diminuindo o tempo e a *chance* de hemorragia vítrea após vitrectomia *pars plana* para hemorragia vítrea ou descolamento de retina tracional, com neovasos de retina ativos.

Por fim, vale lembrar que o glaucoma neovascular também decorre da retinopatia diabética. Como já relatado por nosso grupo (SILVA PAULA et al., 2006), a

injeção intravítrea de bevacizumabe pode levar à regressão da neovascularização do ângulo iridocristaliniano em 1 semana, facilitando o controle clínico da pressão intra-ocular com colírios. No futuro, os agentes anti-VEGF também poderão ser usados pré-operatoriamente para casos de glaucoma neovascular diabético, levando à regressão dos neovasos de íris e diminuindo a *chance* de sangramentos intra-operatórios e hifema pós-operatórios em intervenções cirúrgicas como trabeculectomia, colocação de implantes valvulares e cirurgias de catarata (KRZYSTOLIK et al., 2006).

### **6.3 Dispositivos de liberação prolongada de antiangiogênicos**

Até o momento e baseando-se em consulta do *PubMed*, não há dispositivos para liberação prolongada de antiangiogênicos reportados na literatura. No entanto, especula-se que, no futuro, esses dispositivos sejam uma alternativa para se reduzir o número de injeções que podem ser necessárias, tanto para casos de edema macular diabético, como casos de neovascularização de retina, como também para outras patologias com degeneração macular relacionada à idade. É preciso, no entanto, muito cuidado. Até o momento, tem-se trabalhado com a inibição cíclica ou intermitente do VEGF, por meio de injeções repetidas de antiangiogênicos. Essa tática para antiangiogênese permite que também, ciclicamente, o VEGF aumente entre uma injeção e outra e atue fisiologicamente, mantendo a microcirculação da retina e coróide patente e sem aumentos na área de isquemia (Marco Bonini-Filho, Rodrigo Jorge, Rogério Alves Costa, Estudo IBECA, dados não publicados). Ao se utilizar a inibição crônica do VEGF, será preciso estudar muito bem a dose de antiangiogênico, a fim de se permitir que parte do VEGF produzido pela retina continue a exercer o papel

fisiológico. Talvez drogas mais seletivas, como o pegaptanibe, que inibe apenas a isoforma 165 do VEGF, possam ser utilizadas com maior segurança nesses dispositivos de liberação prolongada de fármacos.



## 7. Referências

Adamis AP, Altaweel M, Bressler NM et al. (2006): Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. *Ophthalmology* **113**:23-28.

Adamis AP, Miller JW, Bernal MT et al. (1994): Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* **118**:445-450.

Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ et al. (1996): Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* **114**:66-71.

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG et al. (1994): Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* **331**:1480-1487.

Aiello LM, Beetham WP, Balodinos MC et al. (1969): Ruby laser photocoagulation in treatment of diabetic proliferating retinopathy: preliminary report. In: Goldberg MF, Fine SL, eds. *Symposium of the Treatment of Diabetic Retinopathy*. (Airlie House, 1968) Public Health Service Publ. No 1980. Washington, DC. US Gov Printing Office: 437-463.

Aiello LP, Pierce EA, Foley ED et al. (1995): Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:10457-10461.

Aiello LP, Gardner TW, King GL et al. (1998): Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* **21**(1):143-156.

Akagi Y, Kador PF, Kuwabara T et al. (1983): Aldose reductase localization in human retinal mural cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **24**(11):1516-1519.

Alves LA (2004): Prevalência da retinopatia diabética na população urbana, adulta de Ribeirão Preto – São Paulo. Dissertação (Mestrado em Oftalmologia). Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. 74 páginas.

Ambati J, Chalam KV, Chawla DK et al. (1997): Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy *Arch Ophthalmol* **115**(9):1161-1166.

Amin RH, Frank RN, Kennedy A et al. (1997): Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**(1):36-47.

Anderson BJ (1980): Activity and diabetic vitreous hemorrhage. *Ophthalmology* **87**(3):173-175.

Arevalo JF, Fromow-Guerra J, Quiroz-Mercado H, Sanchez JG, Wu L, Maia M, Berrocal MH, Solis-Vivanco A, Farah ME; Pan-American Collaborative Retina Study Group (2007): Primary intravitreal bevacizumab (Avastin) for diabetic macular edema: results from the Pan-American Collaborative Retina Study Group at 6-month follow-up. *Ophthalmology* **114**(4):743-750.

Arjamaa O & Nikinmaa M (2006): Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* **83**(3):473-483.

Ashton N, Ward B & Serpell G (1954): Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol* **38**:397.

Ashton N (1957): Retinal vascularization in health and disease: Proctor Award Lecture of the Association for Research in Ophthalmology. *Am J Ophthalmol* **44**(4, Part 2):7-17.

Ausprunk DH & Folkman J (1977): Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* **14**:53-65.

Avery RL (2006): Regression of retinal and iris neovascularization after intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment. *Retina* **26**:352-354.

Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ et al. (2006a): Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* **113**(10):1695.e1-15.

Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD et al. (2006b): Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **113**:363-372.

Banting FG & Best CH (1922): The Internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med* **7**:251-266.

Battegay EJ (1995): Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* **72**:333-346.

Bauer SM, Bauer RJ & Velazquez OC (2005): Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovascular Surg* **39**(4):293-306.

Beetham WP (1963): Visual prognosis of proliferating diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* **47**:611-9.

Beetham WP, Aiello L, Balodimos M et al. (1970): Ruby laser photocoagulation of early diabetic neovascular retinopathy: preliminary report of a long-term controlled study. *Arch Ophthalmol* **83**:261-272.

Beetham WP, Aiello LM, Balodimos MC & Koncz L (1969): Ruby-laser photocoagulation of early diabetic neovascular retinopathy: preliminary report of a long term controlled study. *Trans Am Ophthalmol Soc* **67**:39-67.

Blankenship GW (2000): History of Evolving Treatments for Diabetic Retinopathy. In: Flynn Jr. HW, Smiddy WE. *Diabetes and Ocular Disease: Past, present and future therapies*. San Francisco. American Academy of Ophthalmology Foundation.

Bloodworth JMB Jr & Molitor DL (1965): Ultrastructural aspects of human and canine diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol* **4**:1037.

Bloodworth JMB Jr & Engerman RL (1973): Diabetic microangiography in the experimentally – diabetic dog and its prevention by careful control with insulin. *Diabetes* **22**:290.

Bonini-Filho MA, Jorge R & Barbosa JC (2005): Intravitreal injection versus sub-Tenon's infusion of triamcinolone acetonide for refractory diabetic macular edema: a randomized clinical trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(10):3845-3849.

Boulton M, Foreman D, Williams G & McLeod D (1998): VEGF localization in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* **82**:561-568.

Boycott BB & Dowling JE (1969): Organization of the primate retina: light microscopy. *Proc Roy Soc London (Biol)* **255**:109-176.

Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, Sy JP, Schneider S; ANCHOR Study Group (2006): Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **355**:1432-1444.

Caird FI & Garrett CJ (1963): Prognosis for vision in diabetic retinopathy. *Diabetes* **12**:389-397.

Campbell CJ, Koester CJ, Curtice V et al. (1965): Clinical studies in laser photocoagulation. *Arch Ophthalmol* **74**:57-65.

Campbell CJ, Noyori KS, Rittler MC et al. (1963): Intraocular temperature changes produced by laser coagulation. *Acta Ophthalmol* **76**:22-31.

Campochiaro PA (2000): Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* **184**(3):301-10.

Campochiaro PA (2004): Ocular neovascularisation and excessive vascular permeability. *Expert Opin Biol Ther* **4**(9):1395-1402.

Campochiaro PA and the C99-PKC 412-003 Study Group (2004). Reduction of diabetic macular edema by oral administration of the kinase inhibitor PKC 412. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:922-931.

Casella AMB, Bonomo PP & Farah ME (1994): Prevalência da retinopatia diabética em pacientes diabéticos atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), de Londrina-Paraná. *Arq Bras Oftalmol* **57**(1):5-9.

Chen E & Park CH (2006): Use of intravitreal bevacizumab as a preoperative adjunct for tractional retinal detachment repair in severe proliferative diabetic retinopathy. *Retina* **26**:871-876.

Chen J & Smith LE (2007): Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* **10**(2):133-140.

Chiang YP, Bassi LJ & Javitt JC (1992): Federal budgetary costs of blindness. *Milbank Q* **70**:319-340.

Chun DW, Heier JS, Topping TM et al. (2006): Pilot study of multiple intravitreal injections of ranibizumab in patients with center-involving clinically significant diabetic macular edema. *Ophthalmology* **113**:1707-1712.

Cohen AI (1965): New details of the ultrastructure of the outer segment and ciliary connectives of the rods of human and Macaque retinas. *Anat Rec* **152**:63.

Cohen DL, Thorogood M & Mann JI (1991): A population-based study of incidence of complications associated with type 2 diabetes in the elderly. *Diabet Med* **8**:928-933.

Connolly D, Heuvelman D & Nelson R et al. (1989): Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* **84**:1470-1478.

Conway EM, Collen D & Carmeliet P (2001): Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res* **49**:507–521.

Cooper B, Shah GK, Grand MG et al. (2004): Visual outcomes and complications after multiple vitrectomies for diabetic vitreous hemorrhage. *Retina* **24**:19-22.

Costa RA, Jorge R, Calucci D et al. (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) for choroidal neovascularization caused by AMD (IBeNA Study): results of a phase I dose-escalation study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**:4569-4578.

Cunningham ET Jr, Adamis AP, Altaweel M, Aiello LP, Bressler NM, D'Amico DJ, Goldbaum M, Guyer DR, Katz B, Patel M, Schwartz SD; Macugen Diabetic Retinopathy

Study Group (2005): A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology* **112**:1747-1757.

Da Silva JA (2006): Mensuração da dor clínica: escalas unidimensionais. In: Da Silva JA, Ribeiro-Filho NP. *Avaliação e Mensuração da Dor*. Ribeirão Preto. Funcep: 327-348.

Das A, Frank RN, Zhang NL et al. (1990): Increases in collagen type IV and laminin in galactose-induced retinal capillary basement membrane thickening – prevention by an aldose reductase inhibitor. *Exp Eye Res* **50**:269-280.

Das A & McGuire PG (2003): Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res* **22**(6):721-748.

Davidorf FH, Mouser JG & Derick RJ (2006): Rapid improvement of rubeosis iridis from a single bevacizumab (avastin) injection. *Retina* **26**(3):354-356.

Davis MD (1967): Natural course of diabetic retinopathy. In: Kimura SJ, Caygill WM, eds. *Vascular Complications of Diabetes Mellitus with Special Emphasis on Microangiopathy of the Eye*. St Louis. CV Mosby Co: 139-169.

Davis MD (1968): The natural course of diabetic retinopathy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **72**:237-240.

Davis MD (1969): The natural history of diabetic retinopathy. *Sight Sav Rev* **39**(2):97-103.

Davis MD, Fisher MR, Gangnon RE et al. (1998): Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report 18. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**:233-252.

Davis MD & Blodi BA (2006): Proliferative diabetic retinopathy. In: Ryan SJ, Schachat AP, eds. *Retina: Medical retina*. Vol 2. China. CV Mosby Co: 1285-1322.

Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993): The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **329**:977-986.

Diabetic Retinopathy Study Research Group (1976): Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. *Am J Ophthalmol* **81**:383-396.

Diabetic Retinopathy Study Research Group (1978): Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: the second report of diabetic retinopathy study (DRS) findings. *Ophthalmology* **85**:82-106.

Diabetic Retinopathy Study Research Group (1979): Four risk factors for severe visual loss in diabetic retinopathy: the third report of diabetic retinopathy study. *Arch Ophthalmol* **97**:654-655.

Diabetic Retinopathy Study Research Group (1981a): Design, methods and photocoagulation: a reanalysis of five studies. DRS Report Number 6. *Surv Ophthalmol* **21**:149-209.

Diabetic Retinopathy Study Research Group (1981b): A modification of the Airlie House classification of Diabetic Retinopathy. DRS report Number 7. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **21**:210-226.

Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group (1990). Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy: four-year results of a randomized trial. DRVS report Number 5. *Arch Ophthalmol* **108**:958-964.



Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E & Friedlander M (2007): Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol* **52** (1):S3-S19.

Dvorak H, Brown L, Detmar M & Dvorak AM (1995): Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Ophthalmol* **146**:1029-1039.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1985): Photocoagulation for diabetic macular edema. Report Number 1. *Arch Ophthalmol* **103**:1796-1806.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1987): Techniques for scatter and local photocoagulation treatment of diabetic retinopathy: ETDRS Report number 3. *Int Ophthalmol Clin* **27**:254-264.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1991a): Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. *Ophthalmology* **98**:766-785.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1991b): Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. *Ophthalmology* **98**:823-833.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1991c): Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. *Ophthalmology* **98**(5):786-806.

Eckardt K. Transconjunctival sutureless 23-gauge vitrectomy (2003): *Retina* **25**(2):208-211.

Emanuele N, Sacks J, Klein R et al. (2005): Veterans affairs diabetes trial group. *Diabetes Care* **28**:1954-1958.

Fernandez MLMP, Moura CAA & Jorge PT (1998): Estudo da prevalência da retinopatia diabética no ambulatório da Universidade Federal de Uberlândia. *Arq bras endocrinol metab* **42**(5):368-373.

Folkman J (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**:1182-1186.

Folkman J & D'Amore PA (1996): Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* **87**(7):1153-1155.

Folkman J & Klagsbrun M (1987): Angiogenic factors. *Science* **235**(4787):442-447.

Frank RN, Keirn RJ, Kennedy A et al. (1983): Galactose-induced retinal capillary basement membrane thickening: prevention by sorbinil. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **24**:1519-1524.

Friedman SM & Margo CE (2006): Topical gel vs subconjunctival lidocaine for intravitreal injection: a randomized clinical trial. *Am J Ophthalmol* **142**:887-888.

Fujii GY, De Juan E Jr, Humayun MS et al. (2002). A new 25-gauge instrument system for transconjunctival sutureless vitrectomy surgery. *Ophthalmology* **109**:1807-1812.

Funatsu H, Yamashita H, Nakamura S et al. (2006): Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology* **113**(2):294-301.

Gariano RF & Gardner TW (2005): Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* **438**(7070):960-966.

Garner A (1981): Developments in the pathology of diabetic retinopathy: a review. *J R Soc Med* **74**:427-431.

Goad DL, Rubin J, Wang H et al. (1996): Enhanced Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human SaOS-2 Osteoblast-Like Cells and Murine Osteoblasts Induced by Insulin-Like Growth Factor I. *Endocrinology* **137**:2262-2268.

Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr et al. (2004): VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **351**:2805-2816.

Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C et al. (2000): The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. *Diabetes Care* **23**(4):504-509.

Growth hormone antagonist for proliferative diabetic retinopathy study group (2001): The effect of a growth hormone receptor antagonist drug on proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* **108**:2266-2272.

Gunningham SP, Currie MJ, Han C, et al. (2001): VEGF-B expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *J Pathol* **193**:325–332.

Haritoglou C, Kook D, Neubauer A et al. (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema. *Retina* **26**:999-1005.

Hayashi T, Deguchi K, Nagotani S et al. (2006): Cerebral ischemia and angiogenesis. *Curr Neurovasc Res* **3**(2):119-129.

Hirata CE, Fang T, Casella AMBC et al. (1986): Prevalência de retinopatia em uma população de diabéticos. *Arq Bras Oftalmol* **49**:31-33.

Hogan MJ, Alvarado JA & Weddell JE (1971): *Histology of the human eye: an atlas and textbook*. Philadelphia. Saunders.

Houssay B & Biassoti A (1930): La diabetes pancreatica de los perros hipofisoprivos. *Rev Soc Argent Biol* **6**:251-296.

Houston A (1982): Retinopathy in the Poole area: an epidemiological inquiry. In: Eschwege E, ed. *Advances in diabetes epidemiology*. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Symp 22. Amsterdam: Elsevier: 199–206.

Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M et al. (2006): The regulation of vascular endothelial growth factors (VEGF-A, -C, and -D) expression in the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* **83**(5):1031-1040.

Jorge R, Costa RA, Calucci D et al. (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study). *Retina* **26**(9):1006-13.

Jorge R, Gomes AV, Siqueira RC et al. (2007): 20-Gauge Transconjunctival Pars Plana Vitrectomy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* (in press).

Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L et al. (2003): Phase II trial comparing Bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **21**(1):60-65.

Kaderli B & Avci R (2006): Comparison of topical and subconjunctival anesthesia in intravitreal injection administrations. *Eur J Ophthalmol* **16**:718-721.

Kishore K, Conway MD & Peyman GA (2001): Intravitreal clindamycin and dexamethasone for toxoplasmic retinochoroiditis. *Ophthalmic Surg Lasers* **32**:183-192.

Klein R, Klein BEK, Moss SE et al. (1982): Prevalence of diabetes mellitus in southern Wisconsin. *Am J Epidemiol* **94**:91-106.

Klein R, Klein BEK, Moss SE et al. (1984a): The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, II: prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* **102**:520-526.

Klein R, Klein BEK, Moss SE et al. (1984b): The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, III: prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* **102**:527-532.

Kohner EM (1993): Diabetic retinopathy. *BMJ* **307**:1195-1199.

Kohner EM (2003): Aspirin for diabetic retinopathy. *BMJ* **307**:1060-1061.

Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP et al. (2002): Prevention of experimental choroidal neovascularization with Intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol* **120**:338–346.

Krzystolik MG, Filippopoulos T, Ducharme JF & Loewenstein JI (2006): Pegaptanibe as an Adjunctive Treatment for Complicated Neovascular Diabetic Retinopathy. *Arch Ophthalmol* **124**:920-921.

Kvanta A (1995): Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in choroidal fibroblasts. *Curr Eye Res* **14**(11):1015-10120.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ et al. (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**(4935):1306-1309.

Lindahl P, Johansson BR, Levéen P et al. (1997): Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**(5323):242-245.

Little HL, Zweng HC & Peabody RR (1970): Argon laser slit-lamp retinal photocoagulation. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **74**:85-97.

Luft R, Olivecrona H & Sjogren B (1952): Hypophysectomy in man. *Nord Med* **47**:351-354.

Lutty GA, McLeod DS, Merges C et al. (1996): Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid. *Arch Ophthalmol* **114**(8):971-977.

Machemer R (1974): A new concept for vitreous surgery. 7. Two instrument techniques in pars plana vitrectomy. *Arch Ophthalmol* **92**:407-412.

Machemer R, Buettner H, Norton EW & Parel JM (1971): Vitrectomy: a pars plana approach. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **75**:813-820.

Machemer R, Parel JM & Buettner H (1972): A new concept for vitreous surgery. I. Instrumentation. *Am J Ophthalmol* **73**(1)1-7.

Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V et al. (1994): Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* **112**(11):1476-1482.

Martin PM, Roon P, Van Ells TK et al. (2004): Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(9):3330-3336.

Massin P, Audren F, Haouchine B et al. (2004): Intravitreal triamcinolone acetonide for diabetic diffuse macular edema: preliminary results of a prospective controlled trial. *Ophthalmology* **111**:218-224.

McMeel JW (1971): Diabetic retinopathy: fibrotic proliferation and retinal detachment. *Trans Am Ophthalmol Soc* **69**:440-493.

Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A et al. (1999): A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **18**(2):363-374.

Meyer-Schwickerath G (1950): Koagulation der Netz-haut mit Sonnenlicht. *Ber Dtsch Ophthalmol Ges* **55**:256-259.

Michaelson I (1948): The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal diseases. *Trans Ophthalmol Soc U K* **68**:137-180.

Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA et al. (2005): Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* **112**:1035-1047.

Miller J, Adamis A, D'Amore P et al. (1994): Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primaye model. *Am J Path* **145**:574-584.

Miller JW (1997): Vascular Endothelial Growth Factor and Ocular Neovascularization. *Am J Path* **151**(1):281-291.

Milton R, Aiello L, Davis M et al. (2003): Initial results of the protein kinase C  $\beta$  inhibitor diabetic retinopathy study (PKC-DRS). *Diabetes* **52**(1):A-127 (Abstract n<sup>o</sup>. 544-P).

Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N et al. (1999): Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol* **27**:536-544.

Mulhauser I, Sawicki P & Berger M (1986): Cigarette-smoking as a risk factor for macro-proteinuria and proliferative retinopathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* **29**:500-502.

Murata T, Ishibashi T, Khalil A et al. (1995): Vascular endothelial growth factor plays a role in hypermeability of diabetic retinal vessels. *Ophthalmic Res* **27**:48-52.

Namiecinska M, Marciniak K & Nowak JZ (2005): [VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **59**:573-583.

National Society to Prevent Blindness (1980): Vision problems in the U.S.: A Statistical Analysis. New York. National Society to Prevent Blindness.

Nguyen QD, Tatlipinar S, Shah SM et al. (2006): Vascular endothelial growth factor is a critical stimulus for diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* **142**:961-969.

Oliveira MAB, Godoy MF & Souza DRS (2002): Angiogênese e o fator endotelial de crescimento vascular. *Rev Bras Med* **59**(1/2):81-84.

Okun E & Cibis P (1966): The role of photocoagulation in the therapy of proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* **75**:337-352.



Panisset A, Kohner E, Cheng H et al. (1971): Diabetic retinopathy: new vessels arising from the optic disc. II. Response to pituitary ablation by yttrium 90 implant. *Diabetes* **20**:824-833.

Patel JI, Hykin PG, Schadt M et al. (2006): Diabetic macular oedema: pilot randomized trial of pars plana vitrectomy vs macular argon photocoagulation. *Eye* **20**:873-881.

Patz A, Maumenee AE & Ryan SJ (1971): Argon laser photocoagulation. Advantages and limitations. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **75**(3):569-579.

Peabody RR, Zweng HC & Little HL (1970): Treatment of retinal vascular disease with argon laser slit lamp photocoagulation. *Trans Pac Coast Otoophthalmol Soc Annu Meet* **51**:307-326.

Pe'er J, Shweiki D, Itin A et al. (1995): Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab Invest* **72**(6):638-645.

Pepper MS (1997): Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**:21-43.

Pfeiffer A, Spranger J, Meyer-Schwickerath R et al. (1997): Growth factor alterations in advanced diabetic retinopathy: a possible role of blood retina barrier breakdown. *Diabetes* **46**(2):26-30.

Pierce EA, Avery RL, Foley ED et al. (1995): Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(3):905-909.

Plate KH & Warnke PC (1997): Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* **35**(3):365-372.

Porta M & Bandello F (2002): Diabetic retinopathy: a clinical update. *Diabetologia* **45**:1617-1634.

Poulsen J (1966): Diabetes and anterior pituitary insufficiency: final course and postmortem study of a diabetic patient with Sheehan's syndrome. *Diabetes* **15**:73-77.

Presta M, Dell'Era P, Mitola S et al. (2005): Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**:159-178.

Risau W (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**:671-673.

Robison WG, Kador PF & Kinoshita JH (1983): Retinal capillaries: basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. *Science* **221**:1177-1179.

Robison WG, Kinoshita JH & Kador PF (1986): The polyol pathway in retinal microangiopathy. *Drugs* **32**(2):19-22.

Rodrigues EB, Rossi EE, Grumann Junior A et al. (2006): Treatment of neovascular age-related macular degeneration with antiangiogenic drugs. *Arq Bras Oftalmol* **69**:756-765.

Rosenfeld PJ, Fung AE & Puliafito CA (2005a): Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* **36**:336-339.

Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA & Puliafito CA (2005b): Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for

neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* **36**:33133-33135.

Rosenfeld PJ, Rich RM & Lalwani GA (2006b): Ranibizumab: Phase III clinical trials results. *Ophthalmol Clin North Am* **19**:361-372.

Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY; MARINA Study Group (2006a). Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **355**:1419-1431.

Saishin Y, Saichin Y, Takahashi K et al. (2003): VEGF-TRAP(R1R2) suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J Cell Physiol* **195**:241–248.

Senger DR, Connolly DT, Van de Water L et al. (1990): Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* **50**:1774-1778.

Shima DT, Adamis AP, Ferrara N et al. (1995): Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med* **1**(2):182-193.

Shimuzu K, Kobayashi Y & Muraoka K (1981): Midperipheral fundus involvement in diabetic retinopathy. *Ophthalmology* **88**(7):601-612.

Shweiki D, Itin A, Neufeld G et al. (1993): Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* **91**:2235-2243.

Shweiki D, Itin A, Soffer D et al. (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**:843-845.

Sjollie AK & Geene A (1987): Blindness in insulin-treated diabetic patients with age at onset < 30 years. *J Chron Dis* **40**:215-220.

Silva Paula J, Jorge R, Costa RA et al. (2006): Short-term results of intravitreal bevacizumab (Avastin) on anterior segment neovascularization in neovascular glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand* **84**:556-557.

Souza Jr GS (2003): Estudo da freqüência de retinopatia diabética e fatores associados na população do primeiro Mutirão do Olho Diabético da região de Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado em Oftalmologia). Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cabeça e Pescoço, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. 83 páginas.

Spaide RF & Fisher YL (2006): Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* **26**:275-278.

Starita C, Patel M, Katz B et al. (2007): Vascular endothelial growth factor and the potential therapeutic use of pegaptanib (macugen) in diabetic retinopathy. *Dev Ophthalmol* **39**:122-148.

Steck AD, Esteves RA & Gonçalves JCM (1993): Prevalência de retinopatia diabética em uma população de diabéticos do HC de Franco da Rocha. *Arq Bras Oftalmol* **56**(3):125-128.

Stephan CC & Brock TA (1996): Vascular endothelial growth factor, a multifunctional polypeptide. *P R Health Sci J* **15**(3):169-178.

Sueishi K, Hata Y, Murata T et al. (1996): Endothelial and glial cell interaction in diabetic retinopathy via the function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Pol J Pharmacol* **48**(3):307-316.

Tallquist M & Kazlauskas A (2004): PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**:205-203.

Tasman W (1979): Diabetic vitreous hemorrhage and its relationship to hypoglycemia. *Mod Probl Ophthalmol* **20**:413-414.

Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S et al. (2003): Apoptotic cell death in the lens epithelium of rat sugar cataract. *Exp Eye Res* **77**(1):51-57.

Teixeira A, Moraes N, Farah ME & Bonomo PP (2006): Choroidal neovascularization treated with intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) in angioid streaks. *Acta Ophthalmol Scand* **84**(6):835-836.

Tolentino M, Miller J, Gragondas E et al. (1996): Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* **114**(8):964-970.

Torquato MTCG, Montenegro Jr RM, Viana LAL et al. (2003): Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *São Paulo Med J* **121**(6):224-230.

Tsigkos S, Koutsilieris M & Papapetropoulos A (2003): Angiopoietins in angiogenesis and beyond. *Expert Opin Investig Drugs* **12**:933-941.

Vander JF, Duker JS, Benson WE et al. (1991): Long-term stability and visual outcome after favorable initial response of proliferative diabetic retinopathy to panretinal photocoagulation. *Ophthalmology* **98**:1575-1579.

Von Jaeger E (1855): Beitrage zur Pathologie des Augen. Wien. K.K. Hof- und Staatsdruckerei.

Ulson ACB & Abujamra S (1986): Análise de 400 pacientes diabéticos portadores de retinopatia. Arq Bras Oftalmol **49**(1):9-12.

US Food and Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Disponivel em URL: <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/avastin/default.htm>. [2004 Mai 18]

UK Prospective Diabetes Study Group (1998): Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes (UKPDS 38). Br Med J **317**:703-713.

Wald G (1968): Molecular basis of visual excitation. Science **162**:230.

Wang Y, Gabrielsen A, Lawler PR et al. (2006): Myocardial gene expression of angiogenic factors in human chronic ischemic myocardium: influence of acute ischemia/cardioplegia and reperfusion. Microcirculation **13**(3):187-197.

Warren RS, Yuan H, Matli MR et al. (1996): Induction of Vascular Endothelial Growth Factor by Insulin-like Growth Factor 1 in Colorectal Carcinoma. J Biol Chem **271**:29483–29488.

Werner S & Grose R (2003): Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev **83**(3):835-870.

Wetzig PC & Jepso CN (1966): Treatment of exudative diabetic retinopathy by light coagulation Am J Ophthalmol **62**:459-465.

Wetzig PC & Worlton JT (1963): Treatment of diabetic retinopathy by light coagulation: a preliminary study. Br J Ophthalmol **47**:539-541.

Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ & Schlingemann RO (2003): Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* **22**(1):1-29.

Wise GN (1956): Retinal neovascularization. *Trans Ophthalmol Soc* **54**:729-826.

Xia P, Inoguchi T, Kern T et al. (1994): Characterization of the mechanism for the chronic activation diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* **43**:1122-1129.

Yannuzzi LA, Negrão S, Iida T et al. (2001): Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina* **21**(5):416-434.

Yanyali A, Nohutcu AF, Horozoglu F & Celik E (2005): Modified grid laser photocoagulation versus pars plana vitrectomy with internal limiting membrane removal in diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* **139**:795-810.

Zweng HC (1964): Retinal laser photocoagulation. *Trans Pac Coast Otoophthalmol Soc Annu Meet* **45**:423-439.

Zweng HC, Little HL & Peabody RR (1971): Argon laser photocoagulation of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* **86**(4):395-400.